Aus der Poliklinik fürZahnerhaltung und Parodontologie
der Ludwig-Maximilians-Universität
Vorstand: Prof. Dr. Reinhard Hickel

Einfluß des –308-α-Polymorphismus des Tumor-Nekrose-Faktors-alpha bei Patienten mit chronischer marginaler Parodontitis

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Monika Mende

aus
München

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	PD Dr. med. Dr. med. dent. Matthias Folwaczny
Mitberichterstatter:	PD Dr. T. M. Strom.
	Prof. Dr. E. Albert
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 30. November 2004

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Folwaczny M., Glas J., Török H.P., Mende M., Folwaczny C.: Lack of association between the TNF-α G –308 A promoter polymorphism and periodontal disease. J Clin Periodontol 31, (im Druck) (2004).

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 8

2 Literaturübersicht 9

2.1 Einteilung der marginalen Parodontitiden 9

2.2 Entstehung der chronischen adulten marginalen Parodontitis 10

2.2.1 Modell des "critical pathway" 11

2.2.2 Die Rolle von Mikroorganismen und Plaquebildung bei der Entstehung einer marginalen Parodontitis 14

2.2.3 Virulenzfaktoren - Voraussetzung für das Entstehen einer marginalen Parodontitis 17

2.2.4 Immunabwehrmechanismen 19

2.2.4.1 Die initiale Phase der Immunantwort 19

2.2.4.2 Die zweite Phase der Immunantwort 24

2.2.5 Gewebe- und Knochenabbau bei der marginalen Parodontitis 26

2.2.6 Die Rolle des Tumor-Nekrose-Faktors-α im Entzündungsgeschehen der marginalen Parodontitis 28

2.2.7 Risikofaktoren für die Entstehung marginaler Parodontitiden 30

2.2.8 TNF-α-308-Polymorphismus als Risikofaktor für eine chronische Parodontitis ? 33

3 Fragestellung 35

4 Studienpopulation und Methodik 36

4.1 Probanden 36
4.1.1 Kriterien für die Untersuchungsgruppe 37
4.1.2 Auswahl der Kontrollgruppe 39

4.2 Allgemeine Beschreibung der Methoden 39
4.2.1 Blutentnahme 39
4.2.2 Weiterverarbeitung im Labor 40
4.2.2.1 Trennung in die Fraktionen der Blutbestandteile 40
4.2.2.2 Isolation der DNA 41
4.2.2.3 DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode (Miller et al. 1988) 42
4.2.2.4 Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren 43
4.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der DNA 44
4.2.2.6 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP) 45
4.2.2.7 Agarosegelelektrophorese 46

4.3 Genotypisierung des TNF-α -308G-to-A Polymorphismus (Wilson et al. 1993) 47

5 Statistische Auswertung 51

6 Ergebnisse 52

6.1 Verteilung der Genotypen und Häufigkeit der Allele des TNF-α-308-Polymorphismus 52

6.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele beim TNF-α-308-Polymorphismus unter Berücksichtigung des Geschlechts der Probanden 54

6.3 Genotypen- und Allelverteilung des TNF-α-308-Polymorphismus in Bezug auf den Schweregrad der chronischen Parodontitis 55

6.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung 57

7 Diskussion 60

7.1 Methodik 61

7.1.1 Auswahl der Probanden 61

7.1.1.1 Parodontaler Befund und Klassifizierung 62

7.1.1.2 Ethnische Unterschiede bei genetischen Studien 63

7.1.2 Genotypisierung in Bezug auf den TNF-α-308-Polymorphismus 64

7.2 Einfluß genetischer Faktoren auf die Entstehung einer Parodontitis 64

7.3 TNF-α als Knotenpunkt der Entzündungsreaktion 65

7.4 Allelverteilung des TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismus in der vorliegenden Studie 66

7.5 Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen Studien zu TNF-α-Polymorphismen 67

7.6 Ausblick 70

8 Zusammenfassung 72

9 Literaturverzeichnis 73

10 Anhang 95

10.1 Tabellen 95

10.1.1 Untersuchungsgruppe 95

10.1.2 Kontrollgruppe 99

10.2 Danksagung 103

10.3 Lebenslauf 104

1 Einleitung

Die Parodontitis ist bei Erwachsenen die häufigste Ursache für Zahnverlust (Assuma et al. 1998). Die marginale Parodontitis ist eine durch bakterielle Plaque verursachte, chronisch entzündliche Erkrankung des Zahnhalteapparats (Darveau et al. 1997, Page und Kornman 1997). Sie führt langfristig zur Zerstörung des Desmodonts, des Knochens und des umgebenden Weichgewebes (Kornman et al. 1997). In schweren Fällen kann sie auch den Zahnverlust zur Folge haben (Schroeder 1991). Es ist heute allgemein anerkannt, dass bei der parodontalen Destruktion neben mikrobiellen Faktoren vor allem die zelluläre Immunantwort eine bedeutende Rolle spielt (Page und Kornman 1997; Kornman et al. 1997; Van Dyke et al. 1993). Die Mechanismen sind im einzelnen und vor allem in ihrem gegenseitigen Zusammenspiel noch nicht ausreichend untersucht, auch wenn in den letzten Jahren durch verbesserte analytische Methoden, vor allem im molekularbiologischen Bereich, große Fortschritte gemacht wurden (Page und Kornman 1997). Besonderes Augenmerk wurde dabei auf genetische Polymorphismen gelegt, die als „Marker“ dienen könnten, um das individuelle Erkrankungsrisiko der Patienten einschätzen zu können (Craandijk et al. 2002; Galbraith et al. 1999; Kornman et al. 1997).

Die vorliegende Arbeit soll klären, ob bei Patienten, die an einer chronischen adulten Parodontitis leiden, ein α-Polymorphismus des Tumor-Nekrose-Faktors-α in der Promoterregion –308 vorliegt und ob es einen Zusammenhang zwischen diesem Polymorphismus und dem Verlauf oder der Ausprägung der chronischen adulten Parodontitis gibt.

2 Literaturübersicht

Ätiologie und Pathogenese der marginalen Parodontitis

2.1 Einteilung der marginalen Parodontitiden

Die Parodontitis ist eine opportunistische Infektion der Gingiva und des Zahnhalteapparats. Als Ursache der Parodontitis wird die Bildung von Zahnplaque mit ihren pathogenen Mikroorganismen im Zusammenspiel mit Abwehrreaktionen des Wirtsmechanismus angesehen (Genco 1992; Genco et al. 1984; Page und Schroeder 1981). Sie führt klinisch zu Veränderungen des Attachment-Niveaus und Knochenverlust, Sondierungsblutung und erhöhter Zahnbeweglichkeit.

Die marginale Parodontitis kann in verschiedenen Verlaufsformen auftreten, deren derzeitige Klassifizierung vom klinischen Erscheinungsbild und von der Art und Progression des Attachmentverlusts bestimmt wird.
Die seit 1999 gültige Einteilung der Parodontopathien nach der American Academy of Periodontitis (AAP) unterscheidet hauptsächlich zwischen akuten, aggressiven und chronischen Formen der parodontalen Erkrankungen. Die wichtigsten Vertreter der akuten marginalen Parodontitiden sind die akute nekrotisierende ulzerierende Gingivitis (ANUG) und Parodontitis (ANUP). Zu der Gruppe der aggressiven Parodontitiden zählt man die präpubertäre Parodontitis und die lokalisierte und generalisierte juvenile Parodontitis. Auch die refraktäre Parodontitis gehört hierzu. Zahlenmäßig kommt die chronische Parodontitis am häufigsten vor.
Die Zuordnung individueller Erkrankungsfälle zu den einzelnen Untergruppen kann mitunter schwierig sein, da die Abgrenzungen fließend sein können.

In dieser Arbeit geht es, soweit nicht anders erwähnt, um die chronische Form der marginalen Parodontitis.

2.2 Entstehung der chronischen adulten marginalen Parodontitis

Schon seit langem ging man davon aus, dass bis zu 90 % der erwachsenen Bevölkerung in Industrienationen mindestens einmal im Laufe ihres Lebens an einer Entzündung der Gingiva oder des Parodontiums leiden (Page et al. 1997). Gingivitis und Parodontitis wurden in diesem Zusammenhang als zwei Formen der selben Erkrankung, der marginalen Parodontitis gedeutet. Die empirische Untersuchung zeigt jedoch neuerdings ein ganz anderes Bild; die Prävalenz der chronischen Parodontitis beträgt in Deutschland 45% und liegt damit etwas höher als der europäische Durchschnitt mit 41%. In den USA liegt die Prävalenz der chronischen Parodontitis nur bei 35% (Offenbacher 1996).

Ein großer Teil der untersuchten Patienten litt zwar über viele Jahre an einer persistierenden Gingivitis, hatte aber keinen oder nur geringen Verlust an parodontalem Gewebe. Bei anderen Patienten kam es trotz vergleichbarer Mundhygiene zu massiver und irreversibler Zerstörung von Teilen des Zahnhalteapparats (Offenbacher 1996; Page et al. 1997).

Dies deutet darauf hin, dass individuell verschiedene Faktoren den Krankheitsverlauf so beeinflussen, dass sich bei gleicher Ausgangslage letztendlich verschiedene Erkrankungen manifestieren. Als Ursache kommen hierfür nach heutiger Vorstellung vor allem besonders virulente Keime der parodonthopathogenen Bakterien und individuelle Unterschiede in der Aktivität der immunologischen Abwehrmechanismen in Frage (Hart et al. 1997).

Daneben wurde in letzter Zeit auch der Einfluß von endogenen oder exogenen Risikofaktoren diskutiert. Hier wären beispielsweise bestimmte systemische Er-

krankungen, wie Diabetes mellitus oder chronischer Nikotinabusus als Beispiele anzuführen (Beck et al. 1997; Genco 1996).
Obwohl heute erst einige pathogenetische Einflußgrössen bekannt sind, die in ihrer Wirkung und ihrem Zusammenspiel noch längst nicht ausreichend erforscht sind, hat man dennoch ein neueres und komplexeres Modell für die Entstehung der marginalen Parodontitis gefunden, den sogenannten „critical pathway“. Dieses nimmt vom einfachen Kausal-Prinzip aus Ursache und Wirkung Abstand und versucht den vielseitigen Zusammenhängen des pathogenetischen Geschehens gerecht zu werden (Offenbacher 1996; Salvi et al. 1997).

2.2.1 Modell des „critical pathway“

Auch bei diesem Modell ist die Vernachlässigung der Mundhygiene die primär krankheitsinduzierende Ursache der marginalen Parodontitis. Durch Umwandlung einer residenten Bakterienflora in eine parodonthopathogene Mikroflora im subgingivalen Kompartiment des Zahnes werden immunologische Abwehrmechanismen in Gang gesetzt, die zur klinischen Manifestation einer Entzündung des marginalen Parodontiums führen (Salvi et al. 1997).
Wie allgemein in der Immunologie, geht man auch beim Modell des „critical pathway“ von zwei Phasen der Bakterienabwehr aus. Die erste Phase läßt sich schnell aktivieren, reagiert aber weitgehend unspezifisch. Sie wird im wesentlichen von neutrophilen Granulozyten gebildet, die spezifische und unspezifische Phagozytose betreiben. Hinzu kommen das unspezifisch wirkende Komplementsystem und zusätzlich gegen die invadierenden Keime gerichteten Antikörper, vor allem der IgG-Klasse. Nach dem Modell des „critical pathway“ entscheidet die Effektivität dieser ersten Phase der Immunantwort über den weiteren Verlauf der Erkrankung. Gelingt es den bakteriellen Angriff erfolgreich abzuwehren und eine weitere Invasion und Vermehrung der Bakterien zu verhindern, bleibt die Entzündung mehr oder weniger auf die marginale Gingiva beschränkt. Man spricht dann von einer Gingivitis. Eine irreversible Zerstörung des Zahnhalteap-

parrats findet nicht statt. Kann die Entzündung in der ersten Phase nicht gestoppt werden, werden zunehmend die immunologischen Abwehrmechanismen der zweiten Phase aktiviert. Diese können als Nebenwirkung den Abbau des marginalen Parodontiums bewirken.

Die wichtigsten Zellen in dieser zweiten Phase sind die Monozyten bzw. Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES). Sie steuern im wesentlichen die spezifischen Vorgänge der Immunabwehr, die vor allem durch Lymphozyten und Plasmazellen ausgeführt werden. Weiter unterstützen sie durch die Produktion von spezifisch gegen die parodontopathogenen Bakterien gerichteten Antikörpern die neutrophilen Granulozyten, die die entzündungsauslösenden Bakterien phagozytieren (Grbic et al. 1995; Ebersole et al. 1993). Die aktivierten Makrophagen bzw. Monozyten sezernieren im Rahmen der Immunvorgänge und andere verschiedene Chemokine, die neben der Steuerung und Regulation von Plasmazellen und Lymphozyten auch einen Abbau von Knochen und Bindegewebe verursachen. Dies führt zur irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparats. Insbesondere die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren Interleukin-1β (IL-1β), Interleukin-6 (IL-6), Tumor-Nekrose-Faktor-α (TNF-α) und Prostaglandin E2 (PGE2), aber auch die verstärkte Produktion von gewebeabbauenden Enzymen, wie beispielsweise Matrixmetalloproteinasen Typ 1 und Typ 8 durch die Zellen des RES führt zum Abbau von Gewebe. Da das Ausmaß der Aktivierung der Makrophagen in direktem Zusammenhang mit dem Ausmaß des Angriffs der parodonthopathogenen Bakterien steht, läßt sich daraus schließen, dass die Gewebszerstörung mit zunehmender Anwesenheit von Bakterien und bakteriellen Toxinen ebenfalls zunimmt.
Die Gewebszerstörung zeigt sich klinisch in der Vertiefung des gingivalen Sulkus. In der dadurch entstandenen Zahnfleischtasche ergibt sich wiederum eine Verbesserung der Lebensbedingungen der anaeroben parodonthopathogenen Bakterien, da diese Bakterien durch die Tiefe der Zahnfleischtasche besser vor

Sauerstoffzutritt geschützt sind. Auf der anderen Seite kommt es im Rahmen des entzündlichen Prozesses zur Ausschüttung vasoaktiver Substanzen, die zu einer gesteigerten Sekretion der sogenannten Sulkusflüssigkeit führen. Sie ähnelt in ihrer Zusammensetzung dem Blutplasma. Dadurch wird den krankheitsinduzierenden Bakterien ein größeres Angebot an Nährstoffen zur Verfügung gestellt. An dieser Stelle schließt sich der Kreis des „critical pathway". Die durch die tiefere Tasche verbesserten Lebensbedingungen der parodonthopathogenen Keime können für eine weitere Verstärkung des bakteriellen Angriffs und dadurch für einen erneuten verstärkten Ablauf der beschriebenen pathologischen Prozesse sorgen. Dieser Kreislauf zieht sich ohne entsprechende therapeutische Gegenmaßnahmen so lange hin, bis Knochen und Bindegewebe des Zahnhalteapparats bis zur Wurzelspitze des betroffenen Zahns vollständig abgebaut sind. Dies bedeutet Zahnlockerung und letztendlich Zahnverlust.

Betrachtet man das Modell des „critical pathway", so zeigt sich, dass an mehreren Stellen des Entzündungsprozesses modulierende Faktoren Einfluß auf den weiteren Verlauf der Erkrankung nehmen können, indem das Gleichgewicht zwischen bakteriellem Angriff und immunologischen Abwehrmechanismen zugunsten des bakteriellen Angriffs verändert wird. Kann sich beispielsweise eine besonders virulente bakterielle Flora herausbilden, die sich durch geeignete Strategien dem Angriff der neutrophilen Granulozyten der ersten Abwehrphase entzieht, werden in der Folge verstärkt Mechanismen der sekundären Immunabwehr aktiviert. Diese sind jedoch unweigerlich mit der irreversiblen Zerstörung von parodontalem Gewebe verbunden. Umgekehrt kann durch genetisch oder pathogen determinierte Störungen der ersten Phase der Immunabwehr die effektive Abwehr einer an sich gewöhnlichen bakteriellen Infektion ausbleiben und die Aktivierung der zweiten Phase der Immunabwehr verursachen. Schließlich könnte unter Umständen auch eine Störung der immunologischen Vorgänge die Effektivität der zweiten Phase der Immunabwehr herabsetzen und da-

durch eine unnötig starke und lange Sezernierung der gewebedestruierenden Chemokine und Enzyme induzieren.
Die Komplexität der während der einzelnen Phasen des „critical pathway“ ablaufenden Prozesse und die fast unüberschaubare Zahl der daran beteiligten zellulären Strukturen und interzellulären Kommunikationswege bedingt, dass eine Vielzahl von Möglichkeiten zur Störung des Gleichgewichts aus bakteriellem Angriff und immunologischer Abwehr denkbar sind.

2.2.2 Die Rolle von Mikroorganismen und Plaquebildung bei der Entstehung einer marginalen Parodontitis

Wie schon erwähnt, wird als Ursache der marginalen Parodontopathien im wesentlichen die Vernachlässigung der Mundhygiene angesehen. Als Folge lagern sich harte und weiche Beläge, man spricht von Plaque und Zahnstein bzw. subgingival von Konkrementen, auf der Oberfläche des Zahns ab.
Dentale Plaque ist ein mikrobieller Biofilm (Bradshaw et al. 1996; Busscher et al. 1995). Allgemein werden Biofilme als Ansammlung von bakteriellen Populationen definiert, die vollständig von einer extrazellulären Matrix umgeben sind und untereinander sowie auf einer anorganischen Unterlage haften (Costerton et al. 1994). Sie stellen so etwas wie eigenständige ökologische Gemeinschaften dar, die den parodontopathogenen Mikroorganismen verschiedene evulotionäre Vorteile bieten. Beispielsweise stellt der parodonthopathogene Keim *Porphyromonas gingivalis* das Enzym α-Gingipain bereit, das komplexe Nährstoffe aus der gingivalen Sulkusflüssigkeit oder dem Speichel in kleinere energiereiche Verbindungen spaltet. Diese Produkte stehen dann auch anderen Bakterienarten in der parodontalen Tasche zur Verfügung und können zur Deckung ihres Energiebedarfs herangezogen werden. Innerhalb des Biofilm etablieren sich auch verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen Milieubedingungen, die jedoch über Transportkanäle miteinander in Verbindung stehen. So können die für

die Vermehrung und Stabilisierung jeweils besten Lebensbedingungen der einzelnen Bakterienarten sichergestellt werden (Darveau et al. 1997). Durch die Bereitstellung eines primitiven Transportsystems innerhalb des Biofilms kann zum einen eine bessere Versorgung der einzelnen Kompartimente mit Nährstoffen, zum anderen der schnellere Abtransport von Endprodukten des Stoffwechsels aus den einzelnen Kompartimenten, die möglicherweise in einem anderen Abschnitt noch zur Energiegewinnung weiter metabolisiert werden können, gewährleistet werden (Costerton et al. 1995). Die Struktur des Biofilms bietet den pathogenen Keimen außerdem einen effektiven Schutz gegen die immunologischen Abwehrmechanismen des Wirts und die Wirkung von Antibiotika, da manche Antibiotika die extrazelluläre Matrix des Biofilms nur schwer überwinden können (Khoury et al. 1992) und tiefer gelegene Bakterien vom Antibiotikum nicht erreicht werden (Hoyle et al. 1990). Außerdem besteht die Möglichkeit, dass Bakterien, die gegen das betreffende Antibiotikum resistent sind, den Wirkstoff inaktivieren und er dadurch auch gegen die primär nicht resistenten Bakterien unwirksam ist. Damit kann die Effektivität einer antibiotischen Therapie stark geschwächt werden.

Auch die außerordentlich hohe mechanische Resistenz der Biofilme ist bemerkenswert und stellt ein großes Problem in der Therapie der Parodontalerkrankungen dar, da die vollständige Entfernung des bakteriellen Biofilms bei der mechanischen Reinigung behindert wird (Darveau et al. 1997).

In der menschlichen Mundhöhle sind bisher mehr als 300 Bakterienarten identifiziert worden (Darveau 1997). Bisher ist jedoch kein einzelner Keim als spezifischer Krankheitserreger der marginalen Parodontitis gefunden worden. Dies führte zu dem Schluß, dass die marginale Parodontitis keine spezifische Infektionskrankheit im Sinne der Koch´schen Postulate darstellt (Loesche 1999).

Bei einigen wenigen Erregern aber gibt es einen Zusammenhang zwischen ihrem Auftreten und dem Entstehen einer Parodontitis (Darveau et al. 1997). Pa-

rodonthalpathogene Keime weisen für die Pathogenese bedeutende biochemische Eigenschaften auf (Slots, Genco 1984). Sie sind beispielsweise zur Besiedelung (Adhärenz) von Wurzeloberflächen und Taschen befähigt und behaupten dadurch einen sicheren Standort im mikroökölogischen Kosmos der Taschenflora. Zusätzlich zu diesen grundlegenden auch anderen Bakterien zugesprochenen Eigenschaften, haben sie aber Strategien, um die Abwehrmechanismen des Wirtsorganismus zu umgehen oder auszuschalten (Leukotoxine) und parodontales Gewebe direkt zu schädigen (Endotoxine). So fanden Socransky et al. (1998) vor allem *Porphyromonas gingivalis*, *Tanerella forsythensis* und *Treponema denticola* in aktiven parodontalen Taschen. Andere Autoren konnten zusätzlich zu diesen Keimen eine Assoziation zwischen einer fortschreitenden Parodontitis und den bakteriellen Keimen *Camphylobacter rectus, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum* und *Actinobacillus actinomycetem comitans* finden (Lowenguth et al. 1995; Papapanou et al. 1997). Nach einem Konsensuspapier der American Academy of Periodontology von 1996 werden zu den sehr häufig mit entzündlichen destruktiven Erkrankungen des Parodonts in Zusammenhang gebrachten Bakterien vor allem *Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans* und *Tanerella forsythensis* gezählt.

Auf einem gründlich gereinigten Zahn findet sich schon nach ein paar Stunden ein unstrukturierter Film aus Proteinen und Glycoproteinen, die aus Speichel und Sulkusflüssigkeit stammen (Marsh et al. 1995). Diese Membran bildet spezielle Rezeptoren, an die Bakterien binden können (Scannapieco 1994). Es handelt sich hierbei hauptsächlich um eine Mischflora von aeroben gram-positiven Kokken und Stäbchen, v.a. Streptokokken, Aktinomyceteae und andere (Marsh et al. 1995). Sie gehören fast ausschließlich den Bakterien der residenten Flora an (Duan et al. 1994; Hsu et al. 1994). Diese Pionierkeime können zur Anheftung unter anderem auch Proteine mit antibakterieller Wirkung, wie beispielsweise das Lysozym benutzen (Darveau et al. 1997). Über Fimbrien, Pili und die

sogenannte Glycocalyx, die alle unter dem Begriff der Adhäsine zusammengefasst werden, können sich gram-negative Bakterien in einem weiteren Schritt an die Oberflächenrezeptoren der Pionierkeime, meistens Proteine oder Polysaccharide, anheften und damit indirekt auf dem Weg der sogenannten Koaggregation die Zahnoberfläche besiedeln (Lamont et al. 1993; Whittaker et al. 1996). Die Beobachtung, wonach die Bindung zwischen verschiedenen Keimspezies nicht universell möglich ist, wurde als Erklärung für das erwähnte Auftreten bestimmter Kombinationen verschiedener Bakterien innerhalb eines individuellen subgingivalen Kompartiments herangezogen. Bei der initialen Adhäsionsvermittlung der parodontopathogenen Keime könnten dabei insbesondere verschiedenen *Streptococcus sp.* sowie *Fusobacterium sp.* eine herausragende Rolle zukommen, da diese Keime Oberflächenrezeptoren für die Bindung mit zahlreichen parodontopathogenen Bakterien besitzen (Whittaker et al. 1996).

2.2.3 Virulenzfaktoren - Voraussetzung für das Entstehen einer marginalen Parodontitis

Die parodontopathogenen Mikroorganismen zeichnen sich durch eine ganze Reihe von Virulenzfaktoren aus. Das sind Eigenschaften, die es ihnen ermöglichen, sich gegenüber anderen Spezies durchzusetzen und in bestimmten Geweben zu etablieren. Darüber hinaus können sie sich gegen die Körperabwehr verteidigen und rufen Schädigungen des besiedelten Gewebes hervor (Socransky et al. 1988). Hierzu stehen ihnen eine ganze Reihe von Mechanismen zur Verfügung. So kann die Produktion und Freisetzung bakterieller Enzyme, wie beispielsweise saure Hydrolasen, Lipasen, DNAasen und neutrale Proteasen das Gewebe direkt schädigen und so ein Vordringen der Bakterien erleichtern. Proteolytische Enzyme, zytotoxische Abbau- und Zerfallsprodukte wirken gewebszerstörend. Nachgewiesen werden konnten osteoklastenaktivierende Phosphatasen, Peptidase, fibrinolytische, keratinolytische sowie Trypsin-und Elastaseähnliche Enzyme, die über eine Kollagenaseaktivierung zur Degeneration von

verschiedenen Kollagentypen unter anderem Kollagen Typ IV, als Bestandteil der Basalmembran führen können. Zytotoxisch wirken Metabolite des Bakterienzellstoffwechsels wie Indol, Ammoniak, Schwefelwasserstoff und organische Säuren (Ishikawa et al. 1997). Fimbrien spielen eine Rolle bei der Stabilisierung des Biofilm, da sie es den Bakterien ermöglichen, an Rezeptoren von Epithelien und an der Zahnoberfläche zu haften (Yoshimura et al. 1984). Polysaccharide, die das Bakterium wie eine Kapsel umgeben, schützen vor Phagozytose. Daneben finden sich Exotoxine, die von den Bakterien sezerniert werden. Beim Untergang der Bakterienzelle werden dann Endotoxine freigesetzt. Unter ihnen spielen die Lipopolysaccharide (LPS) eine wichtige Rolle. Sie sind hitzebeständige, biologisch aktive Bestandteile der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien, die in erster Linie bei der Lyse der Bakterien frei werden, aber auch durch Bildung von Vesikeln in das Gewebe gelangen können. LPS vermögen heftige Abwehrreaktionen im Gewebe hervorzurufen, indem sie die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie TNF-α, ProstaglandinE2, IL-1β und IL-6 steigern (Agarwal et al. 1995; Gemmell et al. 1993).

2.2.4 Immunabwehrmechanismen

2.2.4.1 Die initiale Phase der Immunantwort

Betrachtet man die immunologischen Prozesse nach ihrer chronologischen Reihenfolge genauer, so fällt auf, dass die parodontopathogenen Keime anfangs noch weitgehend durch das Saumepithel von den Zellen des Immunsystems getrennt werden. Lange Zeit stellte sich deshalb die Frage, auf welchem Weg das Immunsystem dazu veranlaßt wird, eine Abwehrreaktion des Wirts gegen die bakterielle Infektion zu veranlassen.

Die pathogenen Keime entlassen ständig Bestandteile ihrer Zellwände und Stoffwechselprodukte in den Sulkus (Grenier et al. 1991). Hierunter spielen gesättigte kurzkettige Fettsäuren, wie Butyl- oder Propylsäure, und ein bakterielles Tripeptid, das N-Formyl-methionyl-leucyl-phenylalanin eine Rolle. Als potentester Auslöser einer immunologischen Entzündungsreaktion gilt jedoch das Lipopolysaccharid (LPS) (Loppnow et al. 1989). Die bakteriellen Noxen kommen mit den Zellen des Saumepithels in Kontakt. LPS scheinen sogar die Barriere intakter epithelialer Zellen überwinden zu können und konzentrieren sich um Blutgefäße und in der Lamina propria (Schwartz et al. 1972). Bestandteile der pathogenen Bakterien können mit fast allen Zellen des Parodontiums Bindungen eingehen (Hamada et al. 1990). Dadurch können die Bakterien die immunologische Aktivität des Wirts direkt oder indirekt auslösen (Pugin et al. 1993). Indem Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden und spezifische Oberflächenrezeptoren exprimiert werden, kommt es zur Aktivierung und Rekrutierung der Zellen des Immunsystems am Saumepithel (Kornman et al. 1997). Durch die Anwesenheit bakterieller Noxen sezernieren verschiedene epitheliale Zellen verstärkt Interleukine, wie z.B. IL-1β, IL-6 und IL-8, aber auch TNF-α, sowie eine ganze Reihe weiterer Chemokine und Differzierungsfaktoren (Eckman et al. 1995; Hedges et al. 1994). Analog wurde auch für gingivale Epithelzellen die

verstärkte Produktion von Interleukinen durch die Einwirkung bakterieller Noxen nachgewiesen (Tonetti et al. 1993). Diese Mediatoren diffundieren in das subepitheliale Bindegewebe und induzieren in den Endothelzellen der dort liegenden Blutgefäße die Exprimierung spezifischer Oberflächenrezeptoren. Diese sog. Selektine reagieren in einem zweistufigen Prozeß mit speziellen Zellmembranrezeptoren, den Integrinen, der im Blutstrom befindlichen Leukozyten (Gemmell et al. 1994). Zunächst reagiert das E-Selektin auf der Endothelzellmembran mit dem Lewis-Antigen, einem Molekül, das auf der Oberfläche aller Blutzellen zu finden ist. Dadurch kommt es zur Anheftung von Leukozyten, vor allem von neutrophilen Granulozyten, an die Gefäßwand (Darveau et al. 1997). Durch die Expression von ELAM-1 (endothelial leucocyte adhesion molecule 1) wird die Konzentration des Integrins ICAM-1 (intercellular attachment molecule 1) auf der Oberfläche der vaskulären endothelialen Zellen erhöht. Dieses bindet an den Integrin-Rezeptor LFA-1, einem Adhäsin, auf der Oberfläche der neutrophilen Granulozyten (Genco 1992). Dadurch wird die Leukodiapedese der Leukozyten veranlasst. Grundsätzlich kann bei ausreichend starker Invasion des subepithelialen Bindegewebes auch das Lipopolysaccharid der parodontopathogenen Keime an die Epithelzellen direkt die Exprimierung von leukodiapedeseinduzierenden Selektinen auslösen (Darveau et al. 1997). Auch die Epithelzellen exprimieren unter einem bakteriellen Angriff und der Ausschüttung von Zytokinen ICAM-1 und andere spezifische Oberflächenrezeptoren (Tonetti et al. 1997). Entlang verschiedener Leitschienen wandern die Leukozyten anschließend auf das Zentrum der Infektion zu. Als Leitschiene dienen in diesem Zusammenhang wiederum verschiedene Chemokine sowie Oberflächenrezeptoren der Epithelzellen, vor allem Interleukin-8 sowie ICAM-1 (Tonetti et al. 1994; Moughal et al. 1992). Die Wanderungsrichtung wird durch einen Konzentrationsgradienten der beteiligten Chemokine beziehungsweise Oberflächenrezeptoren vorgegeben. So nehmen sowohl die Konzentration des IL-8 wie auch die von ICAM-1 von der

Oberfläche des Saumepithels zu den basalen Zellschichten hin ab (Genco 1992). Die neutrophilen Granulozyten wandern also Richtung zunehmender Konzentration der Mediatoren der Epithelzellen. Neben IL-8 und den Integrinrezeptoren gibt es zahlreiche chemotaktisch wirksame Verbindungen, wie die Komplementfaktoren C3a und C5a, NCF (neutrophil chemotactic factor) der Makrophagen und die Leukotriene B4, die ebenfalls durch einen intraepithelialen Konzentrationsgradienten die Wanderung der Leukozyten unterstützen. Man spricht von Chemotaxis.

Darüber hinaus regen die Entzündungsmediatoren auch die Fibroblasten zur verstärkten Chemokinproduktion an (Meikle et al. 1994). Die Chemokine bewirken unter anderem, dass das Endothel der Blutgefäße durchlässiger für die Blutbestandteile wird (Kinane et al. 1991).

Zusätzlich neben diesen Botenstoffen, könnten auch intraepitheliale Neuronennetze an der Informationsvermittlung durch das Saumepithel beteiligt sein. So konnte man zumindest im Saumepithel der Ratte ein Netzwerk aus unmyelisierten Neuronen der Klasse C beobachten, die als Transmitter Substance P und calcitonin-verwandtes Peptid benützen (Maeda et al. 1994; Tanaka et al. 1996). Es wird angenommen, dass neben der parakrinen Aktivierung der subepithelialen Blutgefäße auch eine nervöse Steuerung der Endothelzellen stattfindet. Die genaue Funktion dieses dichten neuronalen Netzwerkes ist jedoch noch nicht aufgeklärt.

Neben der Informationsvermittlung scheinen dem Saumepithel weitere Aufgaben im Rahmen der Immunabwehr zugeordnet zu sein. So wurde in jüngerer Zeit postuliert, dass den Keratinozyten des Saumepithels neben der Expression einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren (Fiero et al. 1995) auch die Aufgabe der Phagozytose von Bakterien zukommt. In den Zellen des Saumepithels wurden membranbegrenzte Vesikel nachgewiesen, die degradierende Systeme wie das Calprotectin enthalten (Eversole et al. 1992). Bei der Steuerung der intraepithel stattfindenden Immunprozessen werden die Keratinozyten von immun-

kompetenten Zellen, unter anderem CD1a–positiven, antigenpräsentierenden Zellen vom Langerhans-Typ oder T-Lymphozyten mit dem γδ- oder αIELβ7+-Rezeptor oder dem CD45RO+-Antigen, sogenannten „memory-cells“, unterstützt (Gemell et al. 1995; Tonetti et al. 1993).

Nach der Einwanderung der neutrophilen Granulozyten in das Zentrum der bakteriellen Infektion werden die pathogenen Keime auf dem Weg der Phagozytose in die Zelle aufgenommen und durch verschiedene oxidierende und nicht-oxidierenden Enzymsysteme abgebaut (Dennison et al. 1997). Die oxidierenden Enzymsysteme zerstören die bakterielle Zelle durch Bereitstellung von radikalen Verbindungen, wie das Superoxidanion oder Hydroxylradikale, die hauptsächlich aus dem NADP-Oxidase-System stammen (Dennison et al. 1997). Zu den nicht-oxidierenden Enzymsystemen gehören das Lysozym, Calprotectin und Kathepsin G. Sie greifen die Bakterienzellwand direkt an und sorgen durch die Störung der morphologischen Integrität der Zelle für deren Untergang (Miyasaki et al. 1993). Die phagozytotische Funktion der neutrophilen Granulozyten kann, obwohl grundsätzlich davon unabhängig, durch humorale Faktoren der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr, das Komplementsystem sowie spezifisch gegen die parodontopathogenen Bakterien gerichtete Antikörper wesentlich verstärkt werden. So werden die Keime durch Komplementfragmente, wie C3b oder C4b oder auch durch Immunglobuline der Klasse IgG1 und IgG2, markiert. Die Wirkung dieser Opsonine beruht auf der Expression von Zelloberflächenrezeptoren auf Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Die Komplementfragmente binden an die Komplementrezeptoren CR1-5 aus der β-Integrin-Familie. Von ihnen ist CR-1 am besten untersucht. C3b allein kann die Phagozytose über CR-1 nicht anregen, kann aber die Phagozytose und antimikrobielle Aktivität verstärken, die entweder durch die Bindung von IgG an den Fcγ-Rezeptor oder durch andere Immunmediatoren, wie die Zytokine induziert wurden. Das kleine Komplementfragment C5a kann ebenfalls Makrophagen dazu aktivieren, Bakterien aufzunehmen (Dennison et al. 1997).

An IgG1 oder IgG2 behaftete pathogene Bakterien binden Effektorzellen mit Fcγ-Rezeptoren (Fcγ-R), wie die Makrophagen und PMNs. Menschliche PMNs exprimieren zwei Fc-Rezeptoren: Fcγ-RIIA(CD32), sowie Fcγ(CD16) (Sanders et al. 1995; Wilson et al. 1995). Beide interagieren mit IgG1 und IgG3, obwohl FcγRII die einzige FcγR-Klasse ist, die menschliche IgG2-Komplexe binden kann (Parren et al. 1992; Warmerdam et al. 1991). IgG2 ist die häufigste IgG-Subklasse, die bei der Immunantwort gegen bakterielle kapsuläre Polysaccharide auftritt (Wilson et al. 1995; Ory et al. 1989). Solchermaßen markierte Bakterien können leichter und schneller phagozytiert werden. Während der Phagozytose umfließt die Oberfläche der Phagozyten die Oberfläche des Bakteriums durch sukzessive Bindung von Fcγ-Rezeptoren an gebundene Antikörker-Fcγ-Domänen auf der Phagozytenoberfläche. Die Aufnahme des Partikels führt zu dessen Einschluß in ein saures zytoplasmatisches Vesikel, das als Phagosom bezeichnet wird. Typischerweise fusioniert das Phagosom mit Lysosomen zum Phagolysomen, in dem die Bakterien getötet und durch eine Vielzahl toxischer Substanzen fraktioniert werden (Dennison et al. 1997). Unabhängig davon können pathogene Bakterien auch abgetötet werden, indem Lysosomen mit einer Vielzahl bakterientoxischer Substanzen direkt in das Gewebe in die Nähe der Bakterien gebracht werden. Hierbei wird durch die Wirkung der Myeloperoxidasen, Hydrolasen, Proteasen, Elastasen und Kollagenasen auch das normale Gewebe geschädigt.

Gelingt eine bakterielle Invasion, die vor allem durch die PMNs, das Komplementsystem sowie die spezifischen Antikörker zustandekommt, bleibt die parodontale Entzündungsreaktion zunächst weitgehend auf die marginale Gingiva beschränkt. Konnten die Bakterien erfolgreich eliminiert werden, kann es nach Abheilen der Entzündung zur restitutio ad integrum kommen.

2.2.4.2 Die zweite Phase der Immunantwort

Gelingt eine suffiziente Abwehr der pathogenen Keime nicht, tritt nach dem Modell des „critical pathway“ die zweite Verteidigungsfront der Immunantwort auf. Zuerst kommt es zu einem verstärkten bakteriellen Wachstum. Daraus resultiert schließlich eine verstärkte Invasion der parodontopathogenen Keime in das Saumepithel. Im Gegenzug kommt es zu einer erhöhten Ausschüttung von Entzündungsmeditoren aus dem Wirtsorganismus und zu einem weiteren Fortschreiten der Erkrankung.

Vor allem die hohe Konzentration von LPS erreicht nun auch die kleinen subepithelialen Blutgefäße. Die Endothelzellen werden zur Exprimierung zusätzlicher Selektine veranlasst, insbesondere des *endothelial adhesion molecule 1* (ECAM1). Dieses kann zusammen mit anderen Zelladhäsionsmolekülen, ähnlich wie bei den vorher beschriebenen Vorgängen der Leukodiapedese, zur Einwanderung von Monozyten in das entzündete Gewebe führen (Kornman et al. 1997). Dort werden die Monozyten durch die Bindung von LPS aus der Bakterienzellwand an den TLR4-MD2-CD14-Rezeptorenkomplex aktiviert und zur Sekretion eines weiten Spektrums an Zytokinen und Enzymen veranlasst (Pugin et al. 1994). Zur Bindung an den TLR4-MD2-CD14-Rezeptorenkomplex und seine anschließende Aktivierung ist die vorangehende Bindung eines Ko-Liganden, des Lipopolysaccharid-bindenden Proteins (LBP) an das freie Lipopolysaccharid notwendig (Kinane et al. 2000). Durch den TLR4-MD2-CD14-Rezeptorenkomplex kommt es über ein Protein, das als NOD2/CARD15 bezeichnet wird, und mit Hilfe von RICK zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFλB, der für die Ausschüttung der Entzündungsmediatoren sorgt (Mausumee et al. 2000).

In jüngerer Zeit wurde noch ein zweiter, vom CD14-Rezeptor unabhängiger Aktivierungsweg monozytärer Zellen durch das LPS postuliert. So beschrieben Ziad et al. (1998), dass Makrophagen auch durch LPS, das an Moesin bindet,

aktiviert werden können. Die biologische Bedeutung dieses Aktivierungswegs ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt.

Neben den Zytokinen, wie beispielsweise IL-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, TNF-β und PGE2 schütten die Makrophagen nach der CD14-Rezeptor-vermittelten Aktivierung weitere gewebeabbauende Enzyme aus, insbesondere Matrixmetalloproteinasen (Temelsen et al. 1993; Van Heeckeren et al. 1993; Reynolds et al. 1997). Dies führt schließlich zu einem massiven Abbau kollagener Strukturen des parodontalen Gewebes und somit erstmals zur irreversiblen Zerstörung des Zahnhalteapparats.

Schon bald nach dem Beginn der Immunantwort wandern T- und B-Lymphozyten aus den lymphatischen Organen in das entzündete Gewebe. Native T-Zellen treffen auf Antigenpeptide, die an den Major-Histokompatibilitätskomplex auf der Oberfläche von spezialisierten antigen-präsentierenden Zellen, wie Makrophagen und dentritische Zellen binden. Die T-Zellen reagieren auf diese fremden Antigene mit der Produktion von Effektormolekülen, wie beispielsweise den Lymphokinen und mit erhöhter Proliferationsrate (Ishikawa et al. 1997).

CD4+-T-Lymphozyten, sogenannte T-Helferzellen erkennen Antipeptide im Komplex mit MHC-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche von Makrophagen und Monozyten. CD8+-T-Zellen reagieren auf Antigenpeptide im Komplex mit MHC-Klasse I-Molekülen. Bei Patienten, die an einer Parodontitis leiden, finden sich mehr CD4+-T-Lymphozyten als CD8+-T-Zellen (Nagasawa et al. 1995). Die Aktivierung der T-Zellen erfolgt nach der Bindung des Antigen/MHC-Komplexes an den T-Zellrezeptor mit Hilfe des CD-3-Molekülkomplexes. Zur vollständigen Aktivierung sind weitere ko-stimulierende Signale notwendig (Ishikawa et al. 1997). Die Unterteilung der CD4+-T-Helferzellen in die Untergruppen Th1 und Th2 basiert auf der jeweiligen Zytokin-Produktion. Th1-Zellen produzieren IL-2 und IFN-γ und spielen eine Rolle bei der zellvermittelten Immunantwort. Sie erhöhen die Fähigkeit der Makrophagen, intra- und extrazellu-

läre Pathogene zu eliminieren (Mosman et al. 1996). Th2-Zellen sezernieren IL-4, IL-5, Il-6 und IL-10. Außerdem vermitteln sie bei der Bereitstellung von IgG, IgE und IgA durch B-Lymphozyten (Paliard et al. 1988; Haanen et al. 1991). Vor einiger Zeit wurde auch noch eine dritte Gruppe der T-Helferzellen identifiziert, die IFN-γ, IL-2, IL-4 und IL-5 produziert (Firestein et al. 1989; Street et al. 1990). Auch die CD8+-Zellen können in zwei Gruppen unterteilt werden: zum einen die zytotoxischen Zellen, die IL-10 und IFN-γ produzieren, zum anderen die T-Suppressorzellen, die hauptsächlich IL-4 freisetzen (Salgame et al. 1991). Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass IL-4 und IL-5 in parodontal erkranktem Gewebe nicht sezerniert werden (Fujihashi et al. 1993). Das ungünstige Verhältnis zwischen immunantwortvermittelnden Effektor-T-Zellen, die durch die intensive Ausschüttung von Zytokinen gewebsdestruierend wirken und der Mangel an Suppressorzellen, die die zellvermittelte Immunantwort unterdrücken, könnte relevant sein für die Pathogenese der Parodontitis.
B-Lymphozyten wirken in beiden Phasen der Immunantwort mit. Sie ermöglichen die Bereitstellung von spezifisch wirkenden Antikörpern und sezernieren IL-1, das ein costimulierendes Signal für Th2-Zellen darstellt und an der Zerstörung des parodontalen Gewebes beteiligt ist (Gemell et al. 1997).

2.2.5 Gewebe- und Knochenabbau bei der marginalen Parodontitis

Das jetzt erreichte Stadium der Entzündung des Parodonts äußert sich klinisch durch fortschreitenden Attachmentverlust und Knochenabbau, unter Umständen bis hin zum Verlust der betroffenen Zähne. Ausgelöst wird dies durch die Entzündungsreaktionen als Antwort auf die bakterielle Invasion. Im gesunden Zustand besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen gewebe- und knochenaufbauenden und -abbauenden Zellen, das durch eine Vielzahl von Enzymen, Aktivatoren, Inhibitoren und regulatorischen Molekülen, wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert wird (Reynolds et al. 1997). Durch die Abläufe

während der Immunantwort verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten der destruierenden Faktoren. Prinzipiell können die parodontopathogenen Mikroorganismen die Destruktion auf drei verschiedenen Wegen einleiten. Die Bakterien selbst können proteolytische Enzyme sezernieren, die das Gewebe direkt, ohne Intervention der Abwehrzellen, angreifen. Zum anderen können Produkte der Bakterien, wie Toxine, LPS oder Enzyme direkt residente und eingewanderte Zellpopulationen zur Expression gewebeabbauender Enzyme stimulieren. Weiter besteht die Möglichkeit, dass bakterielle Zellfragmente eine Immunantwort auslösen, die zur Ausschüttung von Zytokinen aus Lymphozyten und Makrophagen führt und schließlich in der Aktivierung degenerativer Abbauwege endet (Birkedal-Hansen et al. 1993). Zielzellen dieser Mediatoren sind nicht nur Zellen des Entzündungsgeschehens, wie polymorphkernige neutrophile Granulozyten, sondern auch Fibroblasten, Keratinozyten und endotheliale Zellen.

Bei den degenerativen Prozessen im Gewebe spielen die Matrixmetalloproteinasen (MMP) eine Schlüsselrolle. Sie werden von Monozyten, Makrophagen, endothelialen Zellen, Keratinozyten und anderen Gewebszellen als Prometalloproteinasen gebildet. Die Aktivierung zu Matrixmetalloproteinasen geschieht an der Zelloberfläche oder in der Nähe der Zelloberfläche. Hierzu bindet Plasminogen-aktivator an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche. Dadurch wird Plasminogen in Plasmin umgewandelt. Plasmin bewirkt bei den meisten Prometalloproteinasen die Umwandlung in MMPs (Temeles et al. 1993; Van Heeckeren et al. 1993). Neben diesem direkten Aktivierungsweg können einige der durch die Makrophagen ausgeschütteten Zytokine, insbesondere IL-1β und TNF-α eine autokrine Verstärkung der Sekretion der Matrixmetalloproteinasen herbeiführen (Reynolds et al. 1997). MMPs können direkt die kollagenen Strukturen des Zahnhalteapparats abbauen. Begleitend wird durch die freigesetzten Zytokine, allen voran IL-1β und TNF-α die Neusynthese von Kollagen durch die Fibroblasten gehemmt (DuFour et al. 1993).

Der Abbau des ossären Anteils des Zahnhalteapparats wird durch Prostaglandin E2 induziert (Offenbacher 1994). Prostaglandin E2 wird direkt von aktivierten Makrophagen ausgeschüttet. Zusätzlich zu dieser direkten Stimulation können über Zytokine, die von immunologischen Zellen im Rahmen der Immunantwort ausgeschüttet werden, mesenchymale Zellen und Osteoklasten zur Ausschüttung von PGE2 veranlasst werden (Schwartz et al. 1997). So wurden in Studien bei Patienten mit marginalen Parodontitiden sowohl erhöhte Spiegel von PGE2 als auch von TNF-α und IL-1 sowohl im parodontalen Gewebe als auch in der Sulkusflüssigkeit gefunden (Offenbacher et al. 1981; Czuszak et al. 1996)

2.2.6 Die Rolle des Tumor-Nekrose-Faktors-α im Entzündungsgeschehen der marginalen Parodontitis

Tumor-Nekrose-Faktor-α, ein Polypeptid, gehört zur Gruppe der Zytokine und ist ein Mediator bei entzündlichen Prozessen. Er wird hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen produziert. Es handelt sich um ein nicht-glycosiliertes Membranprotein, dessen extrazellulärer Anteil als sezernierte Form abgespalten werden kann. Es wird als Prohormon mit 233 Aminosäuren gebildet und reift durch Abspaltung von 76 Signalpeptiden zu einem 157 Aminosäuren umfassenden Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kD (Tracey et al. 1989). Die TNF-α kodierenden Gene sind auf dem Chromosom 6p21-3 lokalisiert. In unmittelbarer Nachbarschaft findet sich auf diesem Chromosomabschnitt der Genlocus des hochpolymorphen MHC-Moleküls (Hajeer et al. 2001; Low et al. 2002). Das TNF-α-Gen ist charakterisiert durch mehrere Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) und Mikrosatelliten in der Promoterregion (Hohjoh et al. 2001). Die Produktion von TNF-α kann prätranskriptional, während der Transkription und posttranskriptional reguliert werden. Variationen in der Promoterregion der TNF-α-Gens modulieren die Stärke der sekretorischen Antwort (Aguillon et al. 2002).

Die Wirkung von TNF-α wird durch Rezeptoren vermittelt, die auf fast allen Körperzellen exprimiert werden. Bei den Rezeptoren unterscheidet man zwei Formen, die von verschiedenen Genen kodiert werden. Die Rezeptoren können von der Oberfläche der Zellen abgespalten werden und treten danach in der interstitiellen Flüssigkeit und im Plasma auf. Die löslichen TNF-α-Rezeptoren fungieren möglicherweise als kompetitive Inhibitoren des TNF-α.

Die TNF-α-Produktion in den Makrophagen wird insbesondere durch das Lipopolysaccharid gram-negativer Bakterien induziert (Molvig et al. 1988). IFN-γ, welches von Th1-Zellen produziert wird, ist ebenfalls ein starker Stimulator für die TNF-α-Produktion. Es stimuliert die Proliferation von Vorläuferzellen der Osteoklasten und bei reifen Osteoklasten den Abbau von Knochen (Assuma et al. 1998). Weiter erhöht TNF-α die chemotaktische Antwort der Leukozyten, indem es die Fähigkeit andere Zellen zu töten stimuliert und die bessere Anheftung der Leukozyten an der Oberfläche der endothelialen Zellen ermöglicht (Beutler et al. 1990). TNF-α erhöht die Permeabilität der Blutgefäße, stimuliert die endothelialen Zellen zur vermehrten IL-1-Produktion und erhöht die Expression von ICAM-1, so dass die PMNs leichter zum Ort der Entzündung wandern können. Durch TNF-α stimulierte mononukleare Zellen und Fibroblasten schütten vermehrt PGE2, Matrixmetalloproteinasen und IL-1 aus. Dies führt zu schnellerem Gewebe- und Knochenabbau (Page 1991).
Die Rolle des TNF-α bei der Pathogenese der chronischen Parodontitis kann jedoch nicht isoliert betrachtet werden, da es immer zu Wechselwirkungen mit anderen Zytokinen kommt, die die Aktivität des TNF-α beeinflussen. So ist die Wirkung des IL-1 und teilweise auch des Lymphotoxins sehr ähnlich der des TNF-α.
Wie kommt es aber zur Ausschüttung des TNF-α aus den Makrophagen?
Diese Frage ist bis heute noch nicht bis ins Detail geklärt. Wie viele Zusammenhänge in der Immunologie, so ist auch dieser Aktivierungsweg nur ein Modell,

das in vivo noch nicht nachgewiesen ist. Nachstehend soll ein stark vereinfachtes Modell der wesentlichen Zwischenschritte zur Aktivierung des TNF-α-Gens dargestellt werden.

Auslösender Faktor ist vor allem das Lipopolysaccharid auf der Oberfläche gram-negativer Bakterien. Dieses bildet mit dem LPS-bindenden Protein im Plasma einen Komplex. Dieser wiederum bindet an den Zelloberflächenrezeptor CD14 auf der Oberfläche von Makrophagen. Zusammen mit dem sogenannten Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) und dem akzessorischen Protein MD2 auf der Oberfläche von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten werden mehrere intrazelluläre Signalwege aktiviert, die schließlich über mehrere Zwischenschritte, an denen verschiedene Enzyme beteiligt sind zur Phosphorylierung von IλB führen. Durch Bindung von IλB an den Transkriptionsfaktor NFλB wird dieser aktiviert und stimuliert im Zellkern die Tanskription proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α. Ein Teil des sezernierten TNF-α kann direkt an der Membran von Makrophagen und PMNs binden und damit die intrazellulären Signalwege in Gang setzen, die zur weiteren Transkription und Sekretion von TNF-α führen. Auf diese Weise kann sehr schnell viel TNF-α ausgeschüttet werden (Guha et al. 2001; Lorenz et al. 2001; Schmitt et al. 2002).

2.2.7 Risikofaktoren für die Entstehung marginaler Parodontitiden

Klinisch fällt immer wieder auf, dass es Patienten gibt, die trotz guter Mundhygiene an einer Parodontitis erkranken und andere, die trotz schlechter Mundhygiene nicht an einer Parodontitis erkranken. Demnach kann das Ausbrechen oder der Verlauf einer Parodontalerkrankung nicht allein von der mikrobiellen Herausforderung abhängen. Es scheint besondere Bedingungen zu geben, die das individuelle Risiko für eine parodontale Erkrankung maßgeblich beeinflussen.

In diesem Zusammenhang wurde in den vergangenen Jahren eine ganze Reihe von Risikofaktoren postuliert. In einigen Fällen konnte jedoch der Zusammenhang zwischen der Pathogenese einer marginalen Parodontitis und dem Risikofaktor nicht gesichert werden. Von einigen Autoren wurde deshalb die Einteilung der unter dem Begriff „Risikofaktor“ zusammengefaßten pathogenen Einflußgrößen hinsichtlich ihrer aktuellen epidemiologischen Wertigkeit und der therapeutischen Beeinflußbarkeit in drei Gruppen vorgeschlagen (Genco et al. 1996). Echte Risikofaktoren sind demnach Faktoren, deren pathogener Einfluß durch kontrollierte longitudinale klinische Studien gesichert ist. Der Einfluß des untersuchten Faktors sowie die Möglichkeit durch geeignete Therapie die Wirkung dieser Einflußgröße aufzuheben sollte dabei durch Interventionsstudien zusätzlich nachgewiesen worden sein. Im Unterschied dazu werden in der Gruppe der Risikomarker oder Risikoindikatoren die Einflußgrößen zusammengefaßt, deren Wirkung aufgrund von Querschnittsstudien oder Fallberichten vermutet wird, die aber letztendlich noch nicht durch kontrollierte Longitudinalstudien bestätigt wurde. Die dritte Gruppe bilden die sogenannten Hintergrundfaktoren. Dies sind Einflußgrößen, deren Zusammenhang mit den ursächlichen Mechanismen einer marginalen Parodontitis zwar als gesichert gilt, die aber durch eine Therapie nicht zu beeinflussen sind. Hierzu gehören Alter, Geschlecht und Hautfarbe des Patienten.

Zu den bislang anerkannten Risikofaktoren zählen der chronische Nikotinabusus und die Diabetes-mellitus Erkrankung sowohl vom Typ I als auch vom Typ II (Kornman et al. 2000; Salvi et al. 1997). Zu den Risikomarkern zählen psychosozialer Stress, Infektion mit spezifischen parodontalen Keimen, Osteoporose und HIV-Infektion (Salvi et al. 1997; Krejci et al. 2000).

Die Pathogenese der Parodontitiden ist nach dem Modell des „critical pathway“ ein komplexes Zusammenspiel zwischen Mikroorganismen und dem Immunsystem des Wirts. Die Effizienz der Immunantwort hängt demnach zum einen von der Pathogenität der Bakterien, zum anderen von internen und externen Ein-

flüssen auf den Wirtsorganismus ab. Den Einfluß einzelner Faktoren zu bestimmen gestaltet sich jedoch bei einem so komplexen und von vielen Faktoren beeinflußten Geschehen sehr schwierig.

In jüngerer Zeit hat man versucht, einzelne genetische Faktoren, die an der Modulation der Immunantwort beteiligt sind herauszufiltern und als Risikofaktoren zu postulieren (Hart et al. 1997). Hinweise auf eine genetische Komponente in der Parodontitis kamen zuerst von der early-onset-periodontitis (EOP), bei der eine familiäre Häufung nachgewiesen wurde (Boughman et al. 1992; Long et al. 1987; Marazita et al. 1994). Es konnte festgestellt werden, dass die Ursachen dieser Erkrankung in erblichen Dysfunktionen neutrophiler Granulozyten liegen, die meist zu einer gestörten Chemotaxis führen (Van Dyke et al. 1994). Im Zusammenhang mit einer erhöhten Anfälligkeit für aggressive und chronische Parodontitiden sind Polymorphismen in den immunglobulinbindenden Fcγ-Rezeptoren auf den Oberflächen phagozytierender Zellen gefunden worden (Kobayashi et al. 2001). Ebenso ist bei einer Mutation auf dem Chromosom 9q32-3, das die Prostaglandin-Endoperoxid-Syntetase-1 kodiert, eine erhöhte ProstaglandinE2-Ausschüttung festgestellt worden.

Ein erst kürzlich endgültig nachgewiesener echter Risikomarker für die Entstehung einer Parodontitis ist der Interleukin-1β-Polymorphismus. Variationen im IL-1-Gen-Cluster des Chromosoms 2 sind mit einer erhöhten Anfälligkeit für adulte Parodontitis verbunden (McDewitt et al. 2000; Laine et al. 2002). Dies ist das erste Mal, dass ein genetischer Polymorphismus identifiziert wurde, der mit einer phänotypischen Variablen in der Immunantwort (IL-1β-Produktion) bei Patienten mit adulter Parodontitis nachgewiesen wurde.

Genetische Polymorphismen existieren in vielen, wenn nicht sogar in den meisten Entzündungs- und Immunmediatoren. Es ist jedoch wahrscheinlich, dass nicht alle Polymorphismen das Risiko der Erkrankung verändern. Es kommt also darauf an, die Polymorphismen der Mediatoren herauszukristallisieren, die das Risiko an einer Parodontitis zu erkranken signifikant erhöhen. We-

gen seiner zentralen Rolle in der Vermittlung der Immunantwort und der Destruktion von parodontalem Gewebe bietet sich hier auch der Polymorphismus des TNF-α an, zumal er auf dem HLA-Abschnitt des Chromosoms 6 lokalisiert ist, auf dem viele Gene kodiert sind, die in der immunologischen Abwehr aktiv sind. Hinzu kommt, dass TNF-α-Polymorphismen für andere Erkrankungen, wie M. Crohn oder Malaria (McGuire et al. 1995) im Zusammenhang mit dem Erkrankungsrisiko und der Schwere der Erkrankung schon nachgewiesen worden sind.

2.2.8 TNF-α-308-Polymorphismus als Risikofaktor für eine chronische Parodontitis ?

Der TNF-α-308-Polymorphismus befindet sich in der Promoterregion des TNF-α-Gens. Durch die Promoterregion wird die Transkription eines Gens reguliert. Generell konnte vor einiger Zeit gezeigt werden, dass ein Polymorphismus einer einzelnen Base in einer Promoterregion sowohl die Transkriptionsrate des Gens, als auch die Produktionsrate des entsprechenden Proteins deutlich verändern kann (Hayashi et al. 1991).

An Position –308 steht in der Originalsequenz des TNF-α-Gens die Nukleinsäure Guanin: GGGGCATG**G**

↑

Position –308

Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass an dieser Stelle Guanin durch Adenin ausgetauscht wird. Da es sich um einen biallelen Polymorphismus handelt, ergeben sich dadurch drei mögliche Genotypen (GG, GA, AA).

In einer von Wilson et al. veröffentlichten Studie (1993) konnte gezeigt werden, dass die Genotypen, die Adenin enthalten (sie werden auch TNF2 genannt), eine vielfach höhere TNF-α- Ausschüttung ins Blutplasma bewirken, als dies bei

homozygoten GG-Trägern der Fall ist. Es konnte jedoch kein Unterschied in der Affinität zu den DNA-bindenden Proteinen zwischen den beiden Allelen festgestellt werden (Wilson et al. 1996). Dies zeigt, dass der TNF-α-308-Polymorphismus direkten Einfluß auf die TNF-α-Gen-Regulation haben könnte und somit verantwortlich sein könnte für sowohl eine höhere TNF-α-Ausschüttung, als auch einen schwereren Krankheitsverlauf bei chronischen Erkrankungen.

3 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Verteilung der Allele G (Guanin) und A (Adenin) des Polymorphismus des TNF-α-Gens in Position –308 bei Patienten mit chronischer adulter marginaler Parodontitis mit parodontal gesunden Probanden zu vergleichen. Daraus könnten Rückschlüsse gezogen werden, ob der TNF-α-308-Polymorphismus als diagnostischer Marker für die Anfälligkeit für eine chronische Parodontitis geeignet ist.

4 Studienpopulation und Methodik

4.1 Probanden

Im klinischen Teil der Studie wurden insgesamt 81 Patienten mit der Diagnose einer chronischen adulten marginalen Parodontitis aufgenommen, die sich in der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie der Ludwig-Maximilians-Universität vorgestellt hatten.

Die chronische Parodontitis wurde anhand folgender klinischer Befunde diagnostiziert:

Messung der Taschensondierungstiefe (TST) an sechs Stellen pro Zahn (mesio-bukkal, medio-bukkal, disto-bukkal, mesio-oral, medio-oral und disto-oral) mit und ohne Auftreten von bleeding on probing (BOP). Die Taschensondierungstiefe wurde vom Gingivarand bis zum Sulkusboden entlang der Zahnachse mit einer Parodontalsonde PCP 10 (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland) gemessen.

Messung des Furkationsbefalls mit Hilfe einer Naber 2-Sonde (Hu-Friedy Europe, Leimen, Deutschland), vom Eingang der Furkation bis zum Defektende in horizontaler Richtung. Die Klassifikation des Grads des Furkationsbefalls erfolgte nach der Einteilung von Nyman und Lindhe (1997) (F I- F III):

Grad I: horizontaler Attachmentverlust bis 3mm

Grad II: horizontaler Attachmentverlust von mehr als 3mm, nicht durchgängig

Grad III: durchgängiger Furkationsbefall.

Zuletzt wurde die Lockerung der Zähne mit Hilfe zweier Instrumentengriffe bestimmt:

Grad I: Krone bis ca. 1 mm auslenkbar

Grad II: Krone mehr als 1 mm auslenkbar

Grad III: Zahn bewegt sich auf Lippen- und Wangendruck, auch in axialer Richtung.

Zur Beurteilung des horizontalen und vertikalen Knochenabbaus wurde ein Orthopantomogramm angefertigt.

4.1.1 Kriterien für die Untersuchungsgruppe

Folgende Kriterien mußten zur Aufnahme in die Untersuchungsgruppe erfüllt sein:

- Mindestens 15 Zähne in situ
- ≥ 8 Zähne mit einer TST von > 5mm an mindestens einem Messpunkt pro Zahn oder Furkationsbefall ≥ Klasse II
- Distanz zwischen Limbus alveolaris und der Schmelz-Zement Grenze ≥ 3mm zirkulär um den betroffenen Zahn als Zeichen des Knochenverlusts

Patienten, die an Diabetes mellitus Typ I/II, hämatologischen Erkrankungen, HIV-Infektion, Osteoporose oder angeborenen Blutungsübeln leiden, wurden von der Studie ausgeschlossen. Weiter durften die Probanden nicht regelmäßig Medikamente einnehmen, insbesondere nichtsteroidalen oder steroidalen Antiphlogistika, Eisenpräparate und Antihistaminika. Schwangere wurden nicht in die Studie aufgenommen. Schließlich mußten alle Patienten Nichtraucher sein.
Von den 81 Probanden der Untersuchungsgruppe waren 52 % Frauen und 48 % Männer. Der jüngste Patient war 19 Jahre alt, der Älteste 74 Jahre. Das Durchschnittsalter (Median) der Patienten betrug 54 Jahre (SD ± 12,4).
Eine Tabelle der Patienten der Untersuchungsgruppe ist im Anhang zu finden.

Anhand der klinischen Ausprägung der Parodontitis wurden die Patienten der Untersuchungsgruppe nochmals in drei Gruppen (milde, moderate und schwere Parodontitis) unterteilt. Es wurden folgende Auswahlkriterien zugrunde gelegt:

Auswahlkriterien	milde Parodontitis	moderate Parodontitis	Schwere Parodontitis
Maximale TST	6 mm	8 mm	> 8 mm
Attachment-verlust > 30 %	≤ 5 Zähne	≤ 8 Zähne	≥ 5 Zähne
Attachment-verlust > 50 %	–	≤ 5 Zähne	≥ 8 Zähne
weibliche Proban-den	14	18	10
männliche Pro-banden	10	15	14
Gesamtzahl der Probanden	24	33	24

Tabelle 1: Klassifikation nach dem Schweregrad der Parodontitis und dem Geschlecht der Probanden der Untersuchungsgruppe

Alle Patienten der Untersuchungsgruppe wurden zu einem Termin in der Klinik und Poliklinik für Zahnerhaltung und Parodontologie einbestellt. In dieser Sitzung wurden die allgemeine und spezielle Anamnese aufgenommen und der parodontale Befundstatus erhoben. Nach der Aufklärung über Art, Umfang und Ziele der Studie und der schriftlichen Einverständniserklärung der Patienten wurde die Blutentnahme durchgeführt.

Die Studie wurde vom Ethikkommittee der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität genehmigt (Nr. 290/01).

4.1.2 Auswahl der Kontrollgruppe

Dieser Untersuchungsgruppe wurde eine Kontrollgruppe aus 121 Probanden gegenübergestellt. Sie durften keine klinischen Anzeichen einer chronischen marginalen Parodontitis haben. Während der letzten fünf Jahre sollten sie sich keiner systematischen und generalisierten Parodontaltherapie unterzogen haben. Es sollten noch mehr als 22 Zähne in situ sein mit einem generalisierten Knochenabbau von weniger als 30 %. Auch in diese Gruppe wurden nur Probanden aufgenommen, die keine systemischen oder medikamentenpflichtigen Erkrankungen hatten. Die Probanden waren zwischen 18 und 73 Jahre alt, der Altersdurchschnitt (Median) lag bei 40 Jahren.
Aus gesundheitlichen und ethischen Gründen wurde auf eine Röntgenaufnahme verzichtet.
Die Daten der Kontrollgruppe sind im Anhang zu finden.

4.2 Allgemeine Beschreibung der Methoden

4.2.1 Blutentnahme

Allen Probanden sowohl der Untersuchungsgruppe als auch der Kontrollgruppe wurde aus der Armbeuge jeweils 9 ml venöses Blut abgenommen. Dazu wurden sterile Röhrchen mit 1,6 mg Kalium-EDTA-Lösung pro ml Blut verwendet (Monovette®, Sarstedt, Nümbrecht). Die Röhrchen wurden nach der Blutentnahme sofort mehrmals vorsichtig gewendet, um das Blut gleichmäßig mit der Kalium-EDTA-Lösung in den Monovetten in Kontakt zu bringen, und dann mit der entsprechenden Probandennummer, dem Namen und dem Geburtsdatum des Patienten versehen.

4.2.2 Weiterverarbeitung im Labor

Die im folgenden beschriebenen Laborarbeiten wurden im gastroenterologischen Labor des Klinikums Innenstadt Ziemssenstr. der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Blutproben wurden im Labor nur unter der Probandennummer weitergeführt, um die Anomymität der Spender während der Versuche zu gewährleisten.

Zur Kontrolle der Ergebnisse wurden in jedem Ansatz je eine Blutprobe von jedem Genotyp (AA, AG und GG) aus einer früheren Studien mit TNF-α-308-Polymorphismen sowie eine Probe mit destilliertem Wasser zur Aufdeckung von möglichen Kontaminationen mitgeführt.

4.2.2.1 Trennung in die Fraktionen der Blutbestandteile

Die Blutproben wurden auf zwei verschiedene Arten, innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme, weiterverarbeitet.

1. Das entnommene Vollblut wurde 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und das überstehende Plasma abgenommen. Der über dem Erythrozytensediment liegende Buffy-coat (Leukozyten und Thrombozyten) wurde abpipettiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gefüllt. Die Aufbewahrung erfolgte bei –20°C.
2. Nach der Abnahme des Plasmas wie unter 1. beschrieben, wurde das Erythrozytensediment samt Buffy-coat (Volumen ca. 5 ml) in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit Erylysepuffer auf 12 ml aufgefüllt. Es folgte eine Inkubation von etwa 10 Minuten, bis die Erythrozyten vollständig lysiert waren. Die Lösung wurde klar und durchsichtig. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 rpm waren die Leukozyten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in 3 ml Ery-Lysepuffer resuspendiert

und für 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Sediment in 1ml Ery-Lysepuffer resuspendiert, in ein 1,5 ml Gefäß überführt und in einer Tischzentrifuge für 5 Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde möglichst komplett abgenommen und verworfen. Das Leukozytensediment wurde entweder bei –20°C aufbewahrt oder gleich wie unter Punkt 4.2.2.2. weiterverarbeitet.

Erylysepuffer: 155 mM NH_4
400 mM NaCl
1 mM Na_2EDTA

4.2.2.2 Isolation der DNA

DNA-Isolierung mit Hilfe des QIAamp® Blood Midi Kit:
In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 200µl Proteinase K (20 mg/ml, Qiagen) gefüllt. 2 ml des zuvor bei Raumtemperatur aufgetauten Blutes/Buffycoats zugegeben und kurz gemischt. Nach Zugabe von 2,4 ml Puffer AL wurde mindestens dreimal für je 5 Sekunden auf dem Vortex-Schüttler gemischt und die Lösung im Wasserbad für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Danach wurden 2 ml absolutes Ethanol zugegeben und mittels Vortex-Schüttler durchmischt. 3 ml der Lösung wurden auf eine sich in einem 15 ml Sammelröhrchen befindende Säule geladen und anschließend für 3 Minuten bei 1850 rpm (1850 g) zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Filtrats wurde der Rest der Lösung auf die Säule geladen und in gleicher Weise zentrifugiert. Das Filtrat wurde wieder verworfen. Anschließend folgten zwei Waschschritte. Zuerst wurden 2 ml Puffer AW1 auf die Säule geladen, für 15 Minuten bei 5000 rpm (4500 g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Im zweiten Waschschritt wurde mit 2 ml Puffer AW2 ebenso verfahren. Zur Eluation der DNA wurde die Säule in ein neues sauberes 15 ml Zentrifugenröhrchen gestellt und 300µl Puffer AE direkt auf die Membran

der Säule aufgetragen. Nach Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde der Überstand 5 Minuten bei 5000 rpm (4500 g) abzentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut auf die Säule aufgetragen und die Zentrifugation wiederholt. Die gewonnene DNA wurde bei –20°C eingefroren.

4.2.2.3 DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode (Miller et al. 1988)

Als Ausgangsmaterial dienten die Leukozyten aus dem abgenommenen Blut. Sie wurden in ein 15-ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen (Spitzboden) überführt und mit ca. 5 ml Kern-Lysepuffer versetzt. Durch Auf- und Abpippettieren sowie Mixen auf dem Vortex-Schüttler werden die Zellen lysiert. Die Zugabe von SDS (Endkonzentration 1%) führt dazu, dass die Kerne lysieren und die DNA frei wird. Nach Zugabe von 150µl Proteinase K (Endkonzentration 0,2 mg/ml) wird die Lösung über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zwischendurch wurde immer wieder auf dem Vortexschüttler gemischt. Dadurch wird die DNA geschert und die vorher zähe Lösung dünnflüssig. Dies ist sehr wichtig, da die DNA sonst als geleeartiges Aggregat vorliegt und bei den weiteren Schritten verloren geht. Gegebenenfalls muß das Volumen des Kernlysepuffers erhöht und die Inkubation verlängert werden. Die Proben wurden anschließend mit 1/3 Volumen 5M NaCl versetzt, um die anderen Zellbestandteile, wie Proteine und Membranen, auszufällen, gut gemischt und für mindestens 30 Minuten bei 4°C kühl gestellt. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation (300 rpm), durch die die Proteine sedimentiert wurden. Der Überstand wurde in ein 15-ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen (Spitzboden) abpippetiert und erneut zentrifugiert (10 Minuten, 3000 rpm). Der Überstand wurde diesmal mit ca. 0,6 Vol. % Isopropanol versetzt und sorgfältig langsam gemischt bis die DNA fadenförmig ausfällt. Sie wurde mit einer zugeschmolzenen Pasteurpipette mit Häkchen aufgenommen. Die so gewonnene DNA wurde zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, die

Alkoholreste entfernt und getrocknet. Die isolierte DNA wurde in 100-300 µl bidestilliertem und autoklaviertem H_2O gelöst. Falls nötig erfolgte die Aufbewahrung bei –20°C.

Kernlysepuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8
400 mM NaCl
10 mM EDTA

SDS: 20 %

Proteinase K: 20 mg/ml

NaCl: 5 M

4.2.2.4 Bestimmung der Konzentration der Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt, da die Nukleinsäuren bei dieser Wellenlänge ein Absorptionsmaximum aufweisen. Nach dem Lambert-Beer´schen Gesetz läßt sich aus dem gemessenen Extinktionswert die Konzentration berechnen.

$$\mathbf{c = E_{260nm} \times f / (\varepsilon \times d)}$$

c = Konzentration (ng/µl)

E_{260nm} = gemessener Extinktionskoeffizient bei 260 nm

f = Verdünnungsfaktor

d = Schichtdicke (1 cm)

ε = Extinktionskoeffizient:

ds DNA: 50^{-1}µl/ ng

RNA: 40^{-1}µl/ ng

Oligonukletide: 30^{-1}µl/ ng

Es wurden Verdünnungen von 1:5 bis 1:20 für die Messung verwendet, so dass die Meßwerte für die Extinktion zwischen 0,1 und 1 lagen, weil nur in diesem Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen Extinktion und Konzentration besteht. Die Messung wurde in einem Photometer Modell Gene Quant Pro RNA/DNA Calculator® (Amersham Pharmacia) durchgeführt.

4.2.2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Vervielfältigung der DNA

Mit der PCR kann eine bestimmte Zielsequenz einer komplexen genomischen DNA selektiv repliziert werden. Als Vorlage reichen wenige Kopien der Zielsequenz aus. Die Methode besitzt eine hohe Spezifität, die gezielte Vermehrung einer bestimmten einzelnen Sequenz ist möglich. Als Primer dienen ca. 15-25 Basen lange Oligonukleotide, die zu den flankierenden DNA-Sequenzen der gewünschten Region komplementär sind. Ein PCR-Ansatz besteht aus einem PCR-Puffer, den Desoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dCTP und dTTP), den Oligonukleotid-Primern, Magnesiumchlorid-Lösung, der Taq-Polymerase, destilliertem Wasser und der als Matrize dienenden Ausgangs-DNA. Die genomische DNA wird in Gegenwart der Primer, die jeweils am 3´-Ende der Zielsequenz anlagern können, und einem großen Überschuß an Olgonukleotiden denaturiert, so dass die Primer beim erneuten Zusammenlagern (annealing) der DNA an die komplementären Sequenzen binden. Eine hitzestabile DNA-Polymerase verlängert den Primer entlang der genomischen Matrizen-DNA. Die Polymerase bleibt auch bei den hohen Temperaturen stabil, die zur DNA-Denaturierung zwischen den Replikationszyklen notwendig sind. Die replizierte DNA wird dabei in ihre Einzelstränge getrennt. Durch Abkühlung kann ein neuer Zyklus aus Primer-Anlagerung und Replikation beginnen, der solange wiederholt wird, bis genügend Kopien der Ziel-DNA vorliegen. Um das Auftreten unspezifischer Amplifikate zu vermeiden, kann eine Hot-Star Taq-DNA-Polyme-

rase verwendet werden, die erst durch eine Erhitzung auf 95°C aktiviert wird. Je nach verwendeter Taq-DNA-Polymerase muß eine einmalige Anfangsdenaturierung von einigen Minuten erfolgen. Die Amplifikation umfaßt 30-40 Zyklen aus Denaturierung, Primeranlagerung und Extention. Der letzte Schritt ist eine einmalige Endextention meist bei 72°C für 10 Minuten, bei der noch unvollständige PCR-Produkte komplettiert werden können. Bei jedem PCR-Ansatz wird eine Negativ-Kontrolle mit Wasser an Stelle der Ziel-DNA mitgeführt.

4.2.2.6 Restriktions-Fragment-Längenpolymorphismus-Analyse (RFLP)

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die spezifisch DNA-Sequenzen erkennen und schneiden. Man unterscheidet zwischen Typ-I-, Typ-II- und Typ-III-Restriktionsendonukleasen, wobei vor allem Typ-II-Restriktionsendonukleasen in der RFLP-Analyse verwendet werden. Diese erkennen Sequenzen, die mit ihrer Komplementärsequenz identisch sind, sogenannte Palindrome, und schneiden innerhalb der Erkennungssequenz. Liegt ein bestimmter Polymorphismus innerhalb einer Erkennungssequenz für ein bestimmtes Restriktionsenzym, läßt er sich durch den Verdau eines PCR-Amplifikats nachweisen, welches die polymorphe Nukleotidposition beinhaltet. Ist keine komplette Erkennungssequenz vorhanden, besteht die Möglichkeit, in der PCR durch eine in einzelnen Nukleotiden von der Ursprungssequenz abweichende Primersequenz eine solche Erkennungsstelle „künstlich“ einzuführen. Voraussetzung ist jedoch, dass in unmittelbarer Nachbarschaft der zu untersuchenden polymorphen Nukloetidposition eine passende Sequenz vorhanden ist, die der Erkennungsstelle für ein bestimmtes Restriktionsenzym ausreichend ähnlich ist. Die polymorphe Nukleotidposition muß dabei Teil der Erkennungsstelle sein. Der Ansatz für einen Restriktionsverdau besteht aus dem zu verdauendem PCR-Produkt, dem Re-

striktionsenzym und einem Puffer. Der Ansatz wird über meist Nacht, jedoch für mindestens zwei Stunden im Brutschrank inkubiert.

4.2.2.7 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient zur Visualisierung der entstandenen Restriktionsfragmente. Dazu wird die DNA in einem elektrischen Feld nach ihrer Größe aufgetrennt. Bei einzelsträngigen Nukleinsäuren spielt auch die Sekundärstruktur eine Rolle. Durch Vergleich mit einem Molekulargewichtsstandard kann die Größe ermittelt und die Konzentration grob abgeschätzt werden. Zusätzlich ist nach der Auftrennung eine präparative Gewinnung eines bestimmten DNA-Fragments möglich, indem die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt wird. Die Banden werden durch den orange fluoreszierenden Farbstoff sichtbar gemacht, der zur Gellösung und zum Laufpuffer zugegeben wird. Abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente werden Agarosekonzentrationen von 1–2,5 % verwendet. Die benötigte Menge Agarose (Sigma-Aldich®, Steinheim, Deutschland) wurde mit 200 ml 1x Laufpuffer durch Aufkochen in einem Mikrowellenofen vollständig gelöst und mit 3µl Ethidiumbromid (10 mg/ml, Sigma) gemischt. In das Geltablett wurden zwei Gelkämme mit jeweils 20 Zähnen eingesetzt, die nach dem Erstarren des Gels vorsichtig gezogen wurden. Das Geltablett wurde in die mit 1x Laufpuffer gefüllte Gelkammer gestellt. Die verdaute DNA-Probe wurde mit Auftragspuffer gemischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Zusätzlich wurde in die erste Spur 20µl eines 100bp-Leiters (Biozym, Hessisch Oldendorf) aufgetragen. Der Lauf erfolgte bei 100 Volt 2 Stunden lang. Anschließend wurde das Gel auf dem Transilluminator betrachtet und fotografiert.

Laufpuffer:	1x TBE mit 0,3 µg/ml Ethidiumbromid
10 x TBE:	890 mm Tris
	890 mM Borsäure
	20 mM EDTA pH 8
6 x Auftragspuffer:	10 mM Tris/HCl pH 8
	2 mM EDTA
	20 % Ficoll 400
	0,25 % Orange G

4.3 Genotypisierung des TNF-α -308G-to-A Polymorphismus (Wilson et al. 1993)

Ziel der Untersuchung war, einen G-to-A-Polymorphismus in der Promoterregion an Position –308 des TNF-α-Gens nachzuweisen. Hierzu wurde eine PCR mit einer RFLP-Analyse verwendet. Entsprechend der umliegenden Sequenz wurde als Restriktionsenzym NcoI gewählt. Dessen Erkennungssequenz ist ein Palindrom der Sequenz 5´...C↓CATGG...3´/ 3´...GGTAC↑C...5´ in der Nähe der zu untersuchenden Position -308. Der Schnitt erfolgt an den gekennzeichneten Stellen in der Erkennungssequenz. NcoI kann dort nur schneiden, wenn an Position –308 Guanin vorhanden ist. Findet sich an dieser Stelle Adenin, so kann das Enzym dort nicht schneiden. Auf diese Weise entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die zur Identifizierung in der anschließenden Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden können.

Folgende Primer wurden verwendet, welche bei TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) hergestellt wurden:

Primer I	5´-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3´
Primer II	5´-TCCTCCCTGCTCCGATTCCG-3´

Die unterstrichene Base im ersten Primer (Cytosin) unterscheidet sich von der Orginal-Sequenz (Guanin an dieser Stelle) und dient zur Einführung der Erkennungsstelle für NcoI.

Für den Ansatz der PCR wurden die HotStar™ Taq-DNA-Polymerase von Qiagen (Hilden,Deutschland) und der dNTP-Mix von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) verwendet. Der PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

Reagens	**Konzentration (Stammlösung)**	**Endkonzentration**	**Volumen**
PCR-Puffer	10 x	1 x (=1,5 mM $MgCl_2$)	5µl
DNTP-Mix	10 mM	0,2 mM	1µl
5´-Primer	10 µM	0,25 µM	1,25µl
3´-Primer	10 µM	0,25 µM	1,25µl
DNA-Polymerase	5 U/µl	0,025 U/µl	0,25µl
$MgCl_2$	25 mM		3µl
H_2O			35,75µl
Summe			47,5µl
DNA			2,5µl
Endvolumen			50µl

Tabelle 2: PCR-Ansatz

Die PCR wurde in dem UNO Thermoblock, BIOMETRA® (Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

	Zyklenzahl	**Zyklendauer**	**Temperatur**
Anfangsdenaturierung	1	15 Minuten	95°C
Denaturierung		30 Sekunden	94°C
Primer-Annealing	35	30 Sekunden	52°C
Extention		30 Sekunden	72°C
Endextention	1	10 Minuten	72°C

Tabelle 3: PCR-Zyklen

Die Restriktion wurde mit Hilfe des Restriktionsenzyms NcoI (New England Biolabs®, Beverly, MD, USA) durchgeführt. Für diese Reaktion wird ein spezifischer Reaktionspuffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bis über Nacht bei 37°C in einem Hybridisierungsofen (Hybridizer HB-1D, Techne, Cambridge, UK).

	Konzentration	**Volumen**
Enzym: NcoI	10000 U/µl	2,5µl
NEBuffer NcoI	10 x	2,5µl
Summe		5µl
PCR-Produkt		20µl
Endvolumen		25µl

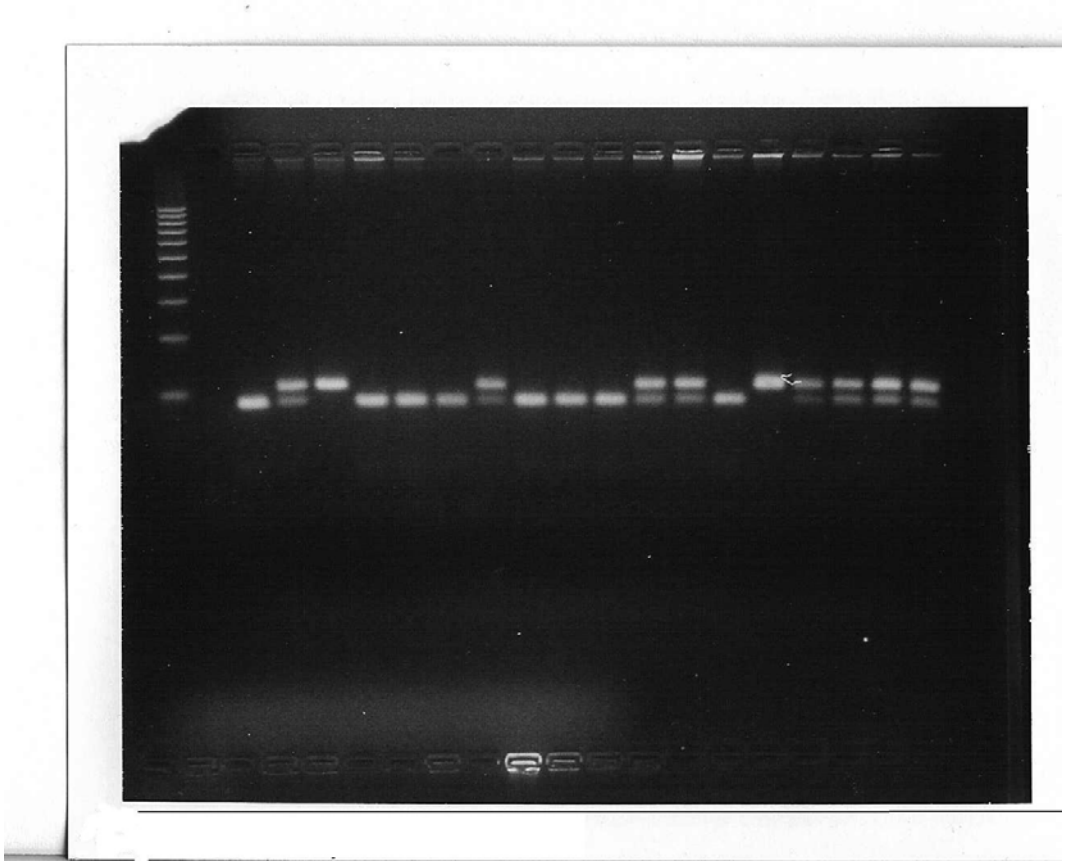
Tabelle 4: Zusammensetzung des Restriktionsverdaus

Nach dem Verdau des PCR-Produkts mit dem Restriktionsenzym NcoI entstehen Produkte folgender Längen:

Genotyp	Länge der Spaltprodukte
GG	87 bp und 20 bp (verdaut)
GA	107 bp (unverdaut), 87 bp und 20 bp (verdaut)
AA	107 bp (unverdaut)

Tabelle 5: Produkte des Restriktionsverdaus

Die Visualisierung der Restriktionsfragmente erfolgte mit der Agarosegelelektrophorese. Die Gelkonzentration war 2 %. Es wurden jeweils 15µl des Restriktionsansatzes mit 5µl 1:1 verdünntem Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurden 20µl der 100bp-Leiter verwendet. Nach zwei Stunden Lauf bei 100 Volt wurde das Gel auf dem Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.



L aqua GG GA AA GG GG GG GA GG GG GG GA GA GG AA GA GA GA GA

Abbildung 1: Foto einer Gelelektrophorese: L = Leiter; aqua = destiliertes Wasser zum Ausschluß einer Kontamination; die ersten drei Proben sind Ansätze aus früheren Studien mit bekanntem Genotyp und dienen der Kontrolle.

5 Statistische Auswertung

Die Analyse der Verteilung der verschiedenen Genotypen des TNF-α-308-Polymorphismus wurde mittels Pearson-Chi-Test durchgeführt. Die Allel-Häufigkeit wurde zwischen den Parodontitispatienten und der Kontrollgruppe verglichen. Hierzu wurde der Fisher´s-exact-Test verwendet. Die Signifikanz wurde für alle Tests auf 5 % festgelegt ($p<0.05$).

6 Ergebnisse

6.1 Verteilung der Genotypen und Häufigkeit der Allele des TNF-α-308-Polymorphismus

Die Untersuchungsgruppe umfaßte insgesamt 81 Patienten. Für die Kontrollgruppe standen 121 Probanden zur Verfügung.

Der Genotyp GA fand sich in der Untersuchungsgruppe bei 33,3 % der Patienten, während es in der Kontrollgruppe 31,4 % waren.

Der homozygote Genotyp AA war bei 2,5 % der Parodontitispatienten vorhanden, in der Kontrollgruppe betrug der Anteil 0,8 % (p=0,592)

Verteilung der Genotypen		
	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
GG	52 (64,2 %)	82 (67,8 %)
GA	27 (33,3 %)	38 (31,4 %)
AA	2 (2,5 %)	1 (0,8 %)

Tabelle 6: Verteilung der Genotypen

Die Grafik verdeutlicht die Verteilung der Genotypen:

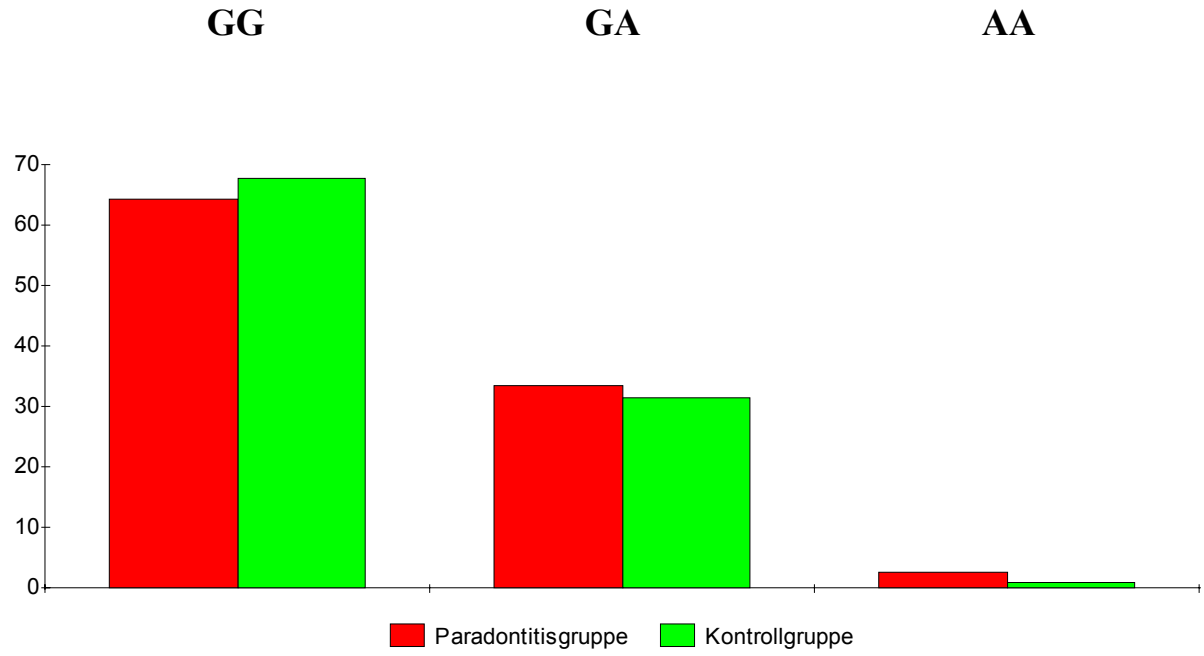


Abbildung 2: Vergleich der Verteilung der Genotypen in Untersuchungs- und Kontrollgruppe

Die Gesamtzahl der TNF-α-308-Allele in der Untersuchungsgruppe betrug 162 Allele, davon waren 19,1 % (31/162) TNF-α-308-A-Allele. In der Kontrollgruppe waren von 242 TNF-α- Allelen 40 A-Allele (16,5 %) (p=0,499).

Häufigkeit der Allele		
	Untersuchungsgruppe	Kontrollgruppe
TNF-α-308 G	131 (80,9 %)	202 (83,5 %)
TNF-α-308 A	31 (19,1 %)	40 (16,5 %)

Tabelle 7: Allelverteilung gesamt

6.2 Genotypenverteilung und Häufigkeit der Allele beim TNF-α-308-Polymorphismus unter Berücksichtigung des Geschlechts der Probanden

In der Untersuchungsgruppe fanden sich 39 Männer und 42 Frauen, so dass sie zu 48 % aus männlichen und zu 52 % aus weiblichen Patienten bestand. Innerhalb der Kontrollgruppe waren 74 (61 %) der Probanden männlich und 47 (39%) weiblich. Der Vergleich der geschlechtsspezifischen Genotypen- und Allelverteilung wies keinen signifikanten Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Probanden auf :

Genotypverteilung der männlichen Probanden		
	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
GG	26 (66,7 %)	49 (66,2 %)
GA	13 (33,3 %)	24 (32,4 %)
AA	0 (0 %)	1 (1,4 %)

Tabelle 8: Genotypenverteilung der männlichen Probanden

Genotypverteilung der weiblichen Probanden		
	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
GG	26 (61,9 %)	33 (70,2 %)
GA	14 (33,3 %)	14 (29,8 %)
AA	2 (4,8 %)	0 (0 %)

Tabelle 9: Genotypverteilung der weiblichen Probanden

Allelhäufigkeit der männlichen Probanden		
	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
TNF-α-308 G	65 (83,3 %)	122 (82,4 %)
TNF-α-308 A	13 (16,7 %)	26 (17,6 %)

Tabelle 10: Allelhäufigkeit der männlichen Probanden

Allelhäufigkeit der weiblichen Probanden		
	Parodontitisgruppe	Kontrollgruppe
TNF-α-308 G	66 (78,6 %)	80 (85,1 %)
TNF-α-308 A	18 (21,4 %)	14 (14,9 %)

Tabelle 11: Allelhäufigkeit der weiblichen Probanden

6.3 Genotypen- und Allelverteilung des TNF-α-308-Polymorphismus in Bezug auf den Schweregrad der chronischen Parodontitis

Untersucht wurde auch die Verteilung der Genotypen und der Allelhäufigkeit unter der Berücksichtigung der Einteilung der chronischen Parodontitis in die Untergruppen nach milder, moderater und schwerer chronischer Parodontitis (Kriterien dieser Unterteilung siehe 4.1.1.)

Als Vergleichswerte dienten die entsprechenden Werte aus der Kontrollgruppe, die aus den obenstehenden Tabellen entnommen wurden.

Genotypenverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis				
	Milde Parodontitis	Moderate Parodontitis	Schwere Parodontitis	Kontrollgruppe
Gesamt	**24**	**33**	**24**	**121**
GG	16	21	15	82
GA	8	11	8	38
AA	0	1	1	1
Männliche Probanden				
GG	8 (80,0 %)	10 (66,7 %)	8 (57,1 %)	49 (66,2 %)
GA	2 (20,0 %)	5 (33,3 %)	6 (42,9 %)	24 (32,4 %)
AA	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	0 (0,0 %)	1 (1,4 %)
Weibliche Probanden				
GG	8 (57,1 %)	11 (61,1 %)	6 (60,0 %)	33 (70,2 %)
GA	6 (42,9 %)	6 (33,3 %)	3 (30,0 %)	14 (29,8 %)
AA	0 (0,0 %)	1 (5,6 %)	1 (10,0 %)	0 (0,0 %)

Tabelle 12: Genotypenverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis

Allelverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis				
	Milde Parodontitis	Moderate Parodontitis	Schwere Parodontitis	Kontrollgruppe
TNF-α-308 G	40 (83,3 %)	53 (80,3 %)	38 (79,2 %)	202 (83,5 %)
TNF-α-308 A	8 (16,7 %)	13 (19,7 %)	10 (20,9 %)	40 (16,5 %)
Männliche Probanden				
TNF-α-308 G	18 (90,0 %)	25 (83,3 %)	22 (78,6 %)	122 (82,4 %)
TNF-α-308 A	2 (10,0 %)	5 (16,7 %)	6 (21,4 %)	26 (17,6 %)
Weibliche Probanden				
TNF-α-308 G	22 (78,6 %)	28 (77,8 %)	15 (75,0 %)	80 (85,1 %)
TNF-α-308 A	6 (21,4 %)	8 (22,2 %)	5 (25,0 %)	14 (14,9 %)

Tabelle 13: Allelverteilung in Bezug auf den Schweregrad der Parodontitis

6.1 Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Der Vergleich zwischen den Genotypen der Untersuchungsgruppe und der Kontrollgruppe mit dem Pearson-Chi-Quadrat-Test erbrachte die nachstehenden Ergebnisse. Bis auf einen Wert lagen alle Vergleichswerte deutlich oberhalb der Signifikanzgrenze von $p < 0,05$. Auch der Vergleich der Allelhäufigkeiten mit dem Fisher´s-exact-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Parodontitis- und der Kontrollgruppe:

Gesamtübersicht der statistischen Verteilung der Genotypen und Allele					
		Genotypen (vs. Kontroll-gruppe)	Allele (vs. Kontroll-gruppe)	Odds ratio	Konfidenz-intervall (95 %)
Parodontitis (gesamt)		p =0,592	P=0,499	1,20	0,64-1,82
Geschlecht	männlich	p =0,766	P=0,865	0,94	0,47-2,02
	weiblich	p =0,278	P=0,257	1,56	0,56-2,61
Schweregrad d. Parodontitis	mild	p =0,893	P=0,981	1,01	0,43-2,02
	moderat	p =0,587	P=0,546	1,24	0,55-2,19
	schwer	p =0,422	P=0,471	1,33	0,52-2,44
Schweregrad der Parodontitis und Geschlecht	mild/ männl.	p =0,663	P=0,394	0,52	0,17-3,45
	moderat/ männl.	p =0,902	P=0,906	0,94	0,49-2,75
	schwer/ männl.	p =0,700	P=0,627	1,28	0,41-3,00
	mild/ weibl.	p =0,001	P=0,412	1,56	0,41-3,53
	moderat/ weibl.	p =0,244	P=0,319	1,63	0,46-3,25
	schwer/ weibl.	p =0,090	P=0,271	1,90	0,41-4,22

Tabelle 14: Gesamtübersicht der statistischen Verteilung der Genotypen und Allele

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Untersuchungs- und der Kontrollgruppe konnte nicht festgestellt werden; lediglich bei den weiblichen Probanden der Untersuchungsgruppe mit milder Parodontitis ergab sich für die Genotypen ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Gruppen, der aber sowohl durch Odds ratio als auch durch das Konfidenzintervall nicht verifiziert werden konnte. Eine klinische Bedeutung ergibt sich hieraus nicht.

7 Diskussion

Mit zunehmendem Lebensalter löst die Parodontitis die Karies als Hauptursache für vorzeitigen Zahnverlust in den industrialisierten Ländern ab. Somit ist die Parodontitis die häufigste Ursache von Zahnverlust. In den meisten Fällen handelt es sich um eine chronische Parodontitis.

Hiermit ist ein entzündliches Geschehen gemeint, das die marginale Gingiva, das parodontale Attachment und den umgebenden Alveolarknochen betrifft. Die Krankheit resultiert aus dem Zusammenwirken von parodontopathogenen Keimen und den dadurch ausgelösten Mechanismen der Immunantwort (Page 1999). Die zuerst lokal beschränkte Entzündungsantwort wird durch Bakterien ausgelöst, die in der Lage sind, Virulenzfaktoren auszuschütten. Die bedeutendste Rolle spielen hierbei die Lipopolysaccharide (Sokransky et al. 1998). Diese Virulenzfaktoren stimulieren die Produktion und Ausschüttung einer Vielzahl von Entzündungsmediatoren, beispielsweise Interleukin (IL)-1β, Interferon (INF)-γ und Tumor-Nekrose-Faktor-α. Direkt oder über verschiedene Zwischenstufen führen sie letztendlich zur Zerstörung von Knochen und Gewebe (Birkedal-Hansen et al. 1993; Graves et al. 2000).

Die Ergebnisse früherer Studien unterstützen die Vorstellung, dass das individuelle Risiko an Parodontitis zu erkranken, durch Unterschiede in der „Handhabung“ der parodontalen Infektion durch den Organismus beeinflußt wird. Diesem Ausgangsgedanken zufolge, der zu dem Modell des „critical pathway“ geführt hat, führt entweder eine unpassende oder eine übertriebene Immunantwort auf eine bakterielle Stimulation hin zu einer unterschiedlichen Anfälligkeit für Parodontitis und/oder zu einem unterschiedlich schwerem Verlauf der Erkrankung (Page et al. 1997). Ebenso werden genetische Marker für die Entstehung einer Parodontitis diskutiert. Aus diesem Zusammenhang heraus ist auch die vorliegende Arbeit entstanden. Sie sollte zeigen, ob der TNF-α-308-Poly-

morphismus als diagnostischer Marker für die Anfälligkeit für chronische Parodontitis geeignet ist.

7.1 Methodik

7.1.1 Auswahl der Probanden

Auswahlkriterium für die vorliegende Studie war unter anderem, dass die Patienten nicht schon an früh beginnenden Parodontitisformen erkrankt waren. Die Gründe für Zahnverluste durch Parodontitis konnten nur aus den anamnestischen Angaben der Probanden erschlossen werden. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass ursächlich Traumata oder ausgedehnte kariöse Defekte für den Zahnverlust verantwortlich waren.

Generell muss man feststellen, dass es zum jetzigen Zeitpunkt keine sicheren diagnostischen Hilfsmittel zur exakten Diagnosestellung der Parodontitis gibt und somit die Aufnahme von Patienten mit anderen Parodontitisformen im Einzelfall nicht ausgeschlossen werden kann.

So stellten auch Mombelli et al. (2002) fest, dass die Zuordnung zu einer spezifischen Entitiät für viele Autoren immer noch problematisch sei. Der Begriff „adulte“ Parodontitis (alte Nomenklatur) werde weiterhin häufiger gebraucht als die jetzt korrekte Bezeichnung „chronische Parodontitis“.

Grundsätzlich ist die Forderung nach einer syndrombezogenen Klassifikation erst dann gerechtfertigt, wenn alle pathogenetischen Vorgänge geklärt sind. Die bis jetzt erlangten Erkenntnisse aus dem Modell des „critical pathway“ haben nur einen Modellcharakter (Tonetti et al. 1999). Des weiteren befindet sich die Nomenklatur zur Einteilung der parodontalen Erkrankungen in einem ständigen Umbruch, da neue Erkenntnisse zur Ätiologie, Epidermiologie, Therapie etc. Revisionen erforderlich machen. Dies erschwert zusätzlich den Vergleich verschiedener Studien.

7.1.1.1 Parodontaler Befund und Klassifizierung

Da die Definitionen der verschiedenen Parodontitsformen nach der AAP großen Spielraum lassen, schränkt jede Studiengruppe ihre Parodontitisfälle nach individuellen Kriterien in Bezug auf Knochenabbau, Blutungsindex und Sondierungstiefen nochmals ein.

Auch für die vorliegende Studien wurden eigene, eindeutige Parameter festgelegt, die zur Diagnose „generalisierte chronische Parodontitis“ führten. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Messergebnisse der Taschensondierungstiefen unter verschiedenen Behandlern differieren können (Armitage et al. 2003). Im vorliegenden Fall wurde die klinische Untersuchung der Probanden von vier verschiedene Behandlern durchgeführt.

Für die vorliegende Studie wurde die Einteilung von den Forschungsgruppen um Wiebe (2000) und Armitage (2003) nach mildem, moderatem und schwerem Stadium der Parodontitis übernommen. Dabei ist bekannt, dass diese Festlegung behandlerabhängig und somit nicht reproduzierbar ist (Scarel-Caminaga et al. 2002; Boch et al. 2001; Kornman et al. 1997).

Die für die Kontrollgruppe ausgewählten Probanden konnten nach der Befunderhebung eindeutig als gesund eingestuft werden. Man muß jedoch bedenken, dass es sich dabei nur um einen momentanen Zustand handeln kann. Die klinische Erfahrung zeigt, dass sich im weiteren zeitlichen Verlauf beim als gesund eingestuften Probanden doch noch eine profunde Parodontitis entwickeln kann. Der Patient würde dann fälschlicherweise als gesund eingestuft werden. Für diesen Fall wäre deshalb eine Verlaufskontrolle sinnvoll. Hier zeigt sich wieder die Problematik der Nomenklatur, da es keinen sicheren histopathologischen Anhaltspunkt zur genauen Festlegung des Ausbruchszeitpunkts der Erkrankung gibt (Mombelli et al. 2002).

Ein weiteres Problem bei der Auswahl der Probanden ist, dass einige anamnestische Angaben der Patienten nicht oder nur schwer überprüft werden können.

Hierzu zählen hauptsächlich Allgemeinerkrankungen, Medikamenteneinnahmen und Nikotinabusus. Gerade für Patienten mit Diabetes mellitus wurde für beide Typen eine erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis und ein schwerer Krankheitsverlauf nachgewiesen (Salvi et al. 1997; Emrich et al. 1991; Shlossman et al. 1990). Wichtig für die Studien könnte aber der verschwiegene Nikotinabusus der Probanden sein. Ein chronischer Nikotinabusus ist ebenfalls mit einem deutlich größeren Risiko für eine Erkrankung des Parodonts assoziiert (Salvi et al. 1997). Im Vergleich zu Nichtrauchern wurde ein 5-7-fach höheres Risiko für die Manifestation einer Parodontalerkrankung festgestellt (Page et al. 1997). Kornman et al. (1997) beschrieben in jüngerer Zeit einen genetischen Polymorphismus für das Interleukin-1 kodierende Gen, der mit einem signifikant häufigerem Auftreten marginaler Parodontopathien einhergeht. In klinischen Studien konnten diese Ergebnisse zuerst jedoch nur für Patienten bestätigt werden, die einem regelmäßigen Nikotinkonsum aufwiesen. Gerade bei Studien mit kleinen Untersuchungs- und Kontrollgruppen hat eine Inhomogenität der Studienkohorte große Auswirkungen auf die Ergebnisse. Da bei diesen Studien hochkomplexe Zusammenhänge untersucht werden, muß dringend versucht werden, solch störende Einflüsse zu vermeiden.

7.1.1.2 Ethnische Unterschiede bei genetischen Studien

Interessanterweise scheint es auch ethnische Unterschiede in der Häufigkeit und Verteilung von TNF-α-Polymorphismen zu geben. So wurden –308- und –238-TNF-α-Polymorphismen in vergleichsweise hohem Vorkommen bei Europäern gefunden, während mehrere andere Polymorphismen fast ausschließlich in der japanischen Bevölkerungsgruppe eine Rolle spielen (Endo et al. 2001). Man nimmt an, dass bei den Europäern dagegen besonders die Position –308 auf dem kodierenden Gen für einen Wechsel in der phenotypischen Expression von TNF-α verantwortlich ist (Kroeger et al. 2000). Da es sich bei den Probanden

der vorliegenden Studie ausschließlich um Europäer handelt, wurde nur der TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismus untersucht.
Die Vermutung liegt jedoch nahe, dass auch ethnische Differenzen zum Scheitern genetischer Studien führen können (Mombelli et al. 2002).

7.1.2 Genotypisierung in Bezug auf den TNF-α-308-Polymorphismus

Die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse ist eine etablierte Methode zum Nachweis von Polymorphismen (Scarel-Caminaga et al. 2002; Laine et al. 2002). Aus ethnischen Gründen wurde nur Position –308 des TNF-α kodierenden Gens untersucht. Die in dieser Arbeit angegebenen Werte für Mengen, Konzentrationen, Zentrifugationszeiten wurden in diversen Vorversuchen ausgetestet und stimmen mit anderen Veröffentlichungen über den TNF-α-308-Polymorphismus weitgehend überein (Wilson et al. 1993).
Anstelle der Gelelektrophorese können Polymorphismen neuerdings auch direkt mit Hilfe von Sequenziergeräten dargestellt werden. Dies führt zu einer deutlichen Zeitersparnis (Hampe et al. 2001).

7.2 Einfluß genetischer Faktoren auf die Entstehung einer Parodontitis

Die Faktoren, die zu Unterschieden in der Immunantwort führen, sind nach Hassell und Harris (1995) vor allem Rasse, Geschlecht und eine genetische Prädisposition. Obwohl es im Allgemeinen akzeptiert ist, dass die chronische Parodontitis einen genetischen Hintergrund hat, spielen epigenetische Faktoren in der Wichtigkeit der Pathogenese der Parodontitis eine wichtige Rolle (Kinane et al. 1999). Daraus resultiert der komplexe multifaktorielle Charakter der Erkrankung. Michalowicz et al. (1991) schätzen jedoch, dass genetische Faktoren in

über 50 % der Fälle bei erhöhter Anfälligkeit für Parodontitis verantwortlich sind.

Auf der Suche nach genetischen Markern wurden mehrere genetische Faktoren, die für die erhöhte Anfälligkeit für Parodontitis verdächtig sind, erst kürzlich identifiziert (Kornman et al. 1997; Gwinn et al. 1999; Hennig et al. 1999). Insbesondere bei der angeborenen (unspezifischen) Immunität werden die Gene, die Moleküle des Immunsystems kodieren, wie die Zytokine, in letzter Zeit fokussiert (Kornman, di Giovane 1998). Einige dieser genetischen Polymorphismen führen wahrscheinlich zu einer veränderten Transkriptionsaktivität und auch zu einer vermehrten Zytokinproduktion im entzündeten Gewebe (Bidwell et al. 1999).

Tatsächlich wurden unterschiedliche Zytokinkonzentrationen, beispielsweise von TNF-α und IL-1β, in der gingivalen Sulkusflüssigkeit und im parodontalen Gewebe bei erkrankten und gesunden Patienten gefunden (Ebersole et al. 1993).

7.3 TNF-α als Knotenpunkt der Entzündungsreaktion

Es gibt mehrere Gründe, warum sich gerade TNF-α für die Suche nach genetischen Polymorphismen im Zusammenhang mit Parodontitis eignet.

Zuerst einmal spielt TNF-α eine zentrale Rolle in der immunologischen Abwehr von Entzündungsprozessen und damit auch in der Entstehung und dem Voranschreiten der Parodontitis. Insbesondere sind hier die Rolle in der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und deren Regulation in der T-Zell-vermittelten Immunabwehr zu erwähnen. Der Faktor ist wichtig in der Regulation der Fibroblastenproliferation und spielt eine wichtige Rolle beim Knochenabbau und der Zerstörung des parodontalen Gewebes.

Weiter wurde beobachtet, dass interindividuelle Unterschiede in der TNF-α-Produktion durch periphere Monozyten und orale Leukozyten im Blut von an Parodontitis erkrankten und nicht erkrankten Patienten vorhanden sind, die ver-

mutlich genetisch determiniert sind (Bendtzen et al. 1988; Pociot et al. 1993; Westendorp et al. 1997; Galbraith et al. 1998). Es ist deshalb auch denkbar, dass Unterschiede in der Anfälligkeit für Parodontitis und im Verlauf der Erkrankung auf genetisch determinierte Unterschiede in der TNF-α-Produktion und Sekretion durch verschiedene Zellen zurückzuführen sind.

Für Träger bestimmter Polymorphismen sind höhere Transkriptionsraten und erhöhte TNF-α-Konzentrationen nachgewiesen worden (Kroeger et al. 1997; Wilson et al. 1997; Louis et al. 1998).

Auch im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Crohn, zerebrale Malaria, rheumatische Athritis (Verweij 1999) oder Alopeceia areata konnten bestimmte TNF-α-Allele als potentielle genetische Marker für diese (chronischen) Erkrankungen aufgezeigt werden.

Schließlich konnte ein entsprechender Polymorphismus bei Interleukin-1β, das als Entzündungsmediator ähnlich wie TNF-α wirkt, nachgewiesen werden (Laine et al. 2002; Dewitt et al. 2000; Kornman et al. 1997). Bis heute gibt es jedoch keine einheitlichen Ergebnisse über die funktionelle Relevanz von TNF-α-Polymorphismen.

7.4 Allelverteilung des TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismus in der vorliegenden Studie

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der TNF-α-Polymorphismus als diagnostischer Marker für die Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer chronischen Parodontitis geeignet ist. Dazu wird ein Kollektiv von Patienten mit einer chronischen Parodontitis mit einer Kontrollgruppe von Probanden ohne klinische Anzeichen einer chronischen Parodontitis verglichen, indem die Verteilung von den Genotypen in beiden Kollektiven nach den oben beschriebenen Methoden untersucht wurde. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe.

Die Hypothese, dass Patienten mit chronischer Parodontitis eine andere Verteilung der Allele G und A des Polymorphismus des TNF-α-Gens in Position 308 aufweisen als parodontal gesunde Patienten, muss demnach zunächst einmal verworfen werden.

So hatten in der Untersuchungsgruppe 64,2 % und in der Kontrollgruppe 67,8 % den Genotyp GG. Den Genotyp GA hatten 33,3 % der Parodontitisgruppe und 31,4 % der Probanden der Kontrollgruppe. 2,5 % der Untersuchungsgruppe und 0,8 % der Kontrollgruppe wiesen den Genotyp AA auf. Es ergab sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppe in der Verteilung der Allele. Es scheint der G-zu-A-Polymorphismus bei TNF-α jedoch generell in der Bevölkerung weit verbreitet zu sein. Unter den ausgewählten Probanden konnte weder ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der Parodontitis und dem TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismus, noch ein Zusammenhang zwischen weiblichen und männlichen Trägern des Polymorphismus nachgewiesen werden.

7.5 Vergleich der vorliegenden Studie mit anderen Studien zu TNF-α-Polymorphismen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen weitgehend mit einer Vielzahl der aktuellen Veröffentlichungen überein. So untersuchten Kinane et al. (1999) IL-10 und TNF-α-Genloci bei Patienten mit EOP (early-onset-Parodontitis). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Untersuchungs- und Kontrollgruppen festgestellt werden. Auch Shapira et al. (2001) untersuchten den G-zu-A-TNF-α-308-Polymorphismus bei Patienten mit EOP. Ein signifikanter Unterschied konnte auch hier im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht festgestellt werden. Ebenso analysierte Endo et al. (2001) Single-Nukleotid-Polymorphismen im TNF-α Gen bei japanischen Patienten mit EOP. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismen und einer erhöh-

ten Anfälligkeit für Parodontitis fand auch seine Forschungsgruppe nicht. In einer der vorliegenden Studie ähnlichen Untersuchung stellten Craandijk et al. (2002) fest, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Anfälligkeit an chronischer Parodontitis zu erkranken und in der Schwere des Krankheitsverlaufs gibt.

Auch in Studien von Pociot et al. (1995) und Kaijzel et al. (1998) zeigte sich, dass der –238-α-Polymorphismus keine funktionellen Unterschiede in der Promoterregion hervorruft.

Auf der anderen Seite konnten jedoch einige Autoren nachweisen, dass Träger des TNF-308-A-Allels wahrscheinlich eine höhere Transkriptionsaktivität haben und somit höhere Levels von TNF-α produzieren (Kroeger et al. 1997; Wilson et al. 1997; Wu et Mc Clain 1997; Louis et al. 1998).

Unterstützt wird die Untersuchung dieser Position durch Studien von Galbraith et al. (1998), die orale PMNs von Parodontitispatienten mit der Transposition von G-zu-A in der Position –308 des TNF-α-Gens mit denen gesunder Patienten verglichen. A-Allel-Träger produzieren signifikant höhere Mengen von TNF-α verglichen mit Wildtypen. Eine andere Gruppe konnte nachweisen, dass ein G-zu-A-Wechsel in Position -308 des TNF-α-Gens zu einer 2-3-fach höheren Transkriptionsrate von TNF-α unter Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden führt (Galbraith et al. 1998). Galbraith zufolge kann die erhöhte Ausschüttung von TNF-α als Antwort auf eine bakterielle Stimulation die Entzündung verstärken und so den destruktiven Immunprozess im infizierten Gewebe vergrößern.

Einige Autoren kommen jedoch zu abweichenden Ergebnissen. So beschrieb Galbraith et al. (1999) eine signifikant unterschiedliche Trägerrate der Allele für Patienten mit fortgeschrittener Parodontitis im Vergleich zu gesunden Individuen. Interessanterweise wurde in dieser Studie das TNF-α-G-Allel (Guanin in Position -308) bei den Parodontitisfällen häufiger gefunden. Gemeinhin wird jedoch das TNF-α-308-A-Allel als Marker für die Erkrankungsanfälligkeit ange-

sehen, weil in allen anderen oben erwähnten Studien sich gezeigt hatte, dass das A-Allel entscheidend ist für den regulatorischen Einfluß, der die TNF-α-Produktion heraufsetzt. Auch Zoughua et al. (2002) konnte in seiner Untersuchung zeigen, dass ein Wechsel von G-zu-A im TNF-α-Gen –308 als Marker für die Anfälligkeit zu parodontalen Erkrankungen sein könnte, da er einen signifikanten Zusammenhang herstellen konnte. Es gibt jedoch auch Studien, die eine erhöhte Häufigkeit des TNF-α-308-A-Allels sowohl für die Gruppe der an Parodontitis erkrankten als auch in der Kontrollgruppe zeigen (Kornman et al. 1997; Galbraith et al. 1998).

Generell ist es jedoch, wie bereits oben beschrieben, aus mehreren Gründen schwierig, die verschiedenen Studien miteinander zu vergleichen. Das Problem der ethnischen Unterschiede wurde bereits angesprochen. Eine abschließende Beurteilung über das Ausmaß des ethnischen Einflusses ist noch nicht gelungen. Während einige Autoren darauf hinweisen, dass so etwas nicht auszuschließen ist (Endo et al. 2001), kommen Hoffmann et al. (2002) zu dem Schluß, dass es zwar Unterschiede in der Verteilung von Polymorphismen bei Zytokinen zwischen verschiedenen ethnischen Populationen gibt, jedoch für TNF-α nicht signifikant nachgewiesen werden konnten. Wahrscheinlich können Differenzen in den Studien wenigstens teilweise auf ethnische Unterschiede zwischen den Studiengruppen zurückgeführt werden.

Als weiteres Problem beim Vergleich der Studien muß bedacht werden, dass, wie schon oben erwähnt, die Definitionen der verschiedenen Parodontitisformen nach AAP sehr großen Spielraum lassen. So werden in den Studien verschiedene Parodontitisformen untersucht und untereinander verglichen. Eine weitere Rolle spielen die unterschiedlichen Kontrollgruppen in den verschiedenen Studien. So stellten einige Autoren den schweren Parodontitisfällen der Untersuchungsgruppe eine Kontrollgruppe mit leichten Parodontitisfällen gegenüber. Andere wie Craandijk stellten die Kontrollgruppe aus einer nicht untersuchten durchschnittlichen Bevölkerungsgruppe zusammen, bei der man annehmen kann, dass

30-40 % nicht entdeckte Parodontitisfälle dabei sind. Um vergleichbare Ergebnisse erreichen zu können, müssten jedem Patientenfall ein in Alter, Geschlecht und Rasse gleicher Proband zugerechnet werden. Dies ließ sich in der vorliegenden Studie ebenfalls nicht realisieren. Hinzu kommt, dass vor allem die Untersuchungsgruppen bei einigen Studien sehr kleine Fallzahlen aufweisen. Um gesicherte Ergebnisse zu erlangen, müssen aber ausreichend Patienten vorhanden sein, um Ungenauigkeiten zu vermeiden. Die vorliegende Studie dürfte mit 81 Patientenfällen und 121 Probanden in der Kontrollgruppe dieses Kriterium erfüllen.

7.6 Ausblick

Bei der Entstehung von entzündlichen Parodontalerkrankungen spielen viele Faktoren eine Rolle. Obwohl es allgemein akzeptiert ist, dass die chronische Parodontitis einen genetischen Hintergrund hat, sind auch epigenetische Faktoren für die Pathogenese der Parodontitis sehr wichtig (Kinane et al. 1999). Daraus resultiert ein komplexer multifaktorieller Charakter der Erkrankung. Viele Polymorphismen der Entzündungsmediatoren sind in diesem Zusammenhang entdeckt und untersucht worden, nicht alle scheinen jedoch einen modulierenden Einfluß auf die Erkrankung zu haben (Hart et al. 1997). Ein weiteres Problem ist, dass der Erbgang nicht nach den Mendelschen Gesetzen erfolgt, sondern eine Vielzahl von Genen beteiligt sind. Deswegen mag die Analyse eines einzelnen genetischen Polymorphismus nur ein unzureichendes Werkzeug sein, um an das Ziel zu gelangen, den genetischen Hintergrund parodontaler Erkrankungen zu beschreiben. Wichtig wäre hierzu, verschiedene Polymorphismuskombinationen bei einzelnen Individuen miteinander zu vergleichen. So sind Single-Nukleotid-Polymorphismen (SNPs) im TNF-α-Gen anerkanntermaßen mit unterschiedlichem Schweregrad der Entzündungsreaktion assoziiert. Ob diese Phänomen jedoch auf dem direkten Einfluß der SNPs beruht oder ein Hinweis auf

ein Ungleichgewicht mit anderen Polymorphismen im TNF-α-Gen oder im HLA-System ist, wird derzeit noch kontrovers diskutiert (Hajeer et al. 2001). De Jong et al. (2002) schlossen nach der Untersuchung von endotoxinstimulierten Blutzellen unter anderem auf den TNF-α-308-Polymorphismus, bei der sowohl Allele der TNF-α-Mikrosatelliten als auch Trägerschaften von TNF-α-Polymorphismen nicht relevant für die TNF-α-Produktion waren, dass die Gene, die für die Unterschiede in der endotoxininduzierten TNF-α-Produktion verantwortlich sind, noch nicht identifiziert worden sind. Grundsätzlich ist zu bedenken, dass es sich bei allem bis jetzt bekanntem Wissen um Thesen handelt, die aus gedanklichen Modellvorstellungen hervorgehen.

8 Zusammenfassung

Bestrebungen in der Forschung gehen dahin, verbesserte diagnostische Möglichkeiten zu entwickeln, um eine besondere Anfälligkeit der Patienten für Parodotitiden zu ermitteln. Dabei konzentrieren sich die Untersuchungen seit einigen Jahren auf immunrelevante genetische Polymorphismen, die die Ausschüttung von Zytokinen und damit die Effektivität der Immunantwort regulieren.

Eine zentrale Rolle spielt bei der Entstehung der Parodontitis der Entzündungsmediator TNF-α, der direkt und indirekt sowohl an der Vermittlung der Immunantwort selbst als auch am Verlust des parodontalen Gewebes beteiligt ist.

Entscheidend für die vermehrte Ausschüttung von TNF-α ist ein Polymorphismus in der Promoterregion des TNF-α-kodierenden Gens an Position –308, bei dem G (Guanin) durch A (Adenin) ersetzt wird. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Allelverteilung des TNF-α-308-Polymorphismus bei einer Gruppe parodontal erkrankter Probanden mit einer gesunden Kontrollgruppe zu vergleichen. Anhand dieser Daten sollte beurteilt werden, ob der TNF-α-308-G-zu-A-Polymorphismus die Schwere und den Verlauf einer chronischen adulten Parodontitis beeinflußt und somit als diagnostischer Marker in Betracht kommt.

Als Untersuchungsgruppe wurden 81 Patienten, die an einer chronischen adulten Parodontitis erkrankt waren, ausgewählt. Als Kontrollgruppe dienten 121 parodontal gesunde Probanden ohne Allgemeinerkrankungen. Mittels PCR und RFLP wurde der Genotyp bestimmt.

Die statistische Auswertung ergab, dass die Allelhäufigkeit und die Verteilung der Genotypen des TNF-α-Gens in Untersuchungs- und Kontrollgruppe vergleichbar war. Auch durch Stratifikation der Untersuchungsgruppe nach der Stärke der klinischen Ausprägung der Parodontitis fand sich kein Unterschied der Allelhäufigkeit. Somit konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen TNF-α-308-Polymorphismus und einer Erkrankung an chronischer adulter Parodontitis nachgewiesen werden.

9 Literaturverzeichnis

Agarwal S, Piesco NP, Johns JP, Ricelli AE. Differential expression of Il-1beta, TNF-alpha,Il-6 and Il-8 in human monocytes in response to lipopolysaccharides from different microbes. J Dent Res (1995); 74: 1057-1065.

Aguillon JC, Cruzat A, Cuenca J, Cuchacovich M. Tumor necrosis factor alpha genetic polymorphism as a risk factor in disease. Rev Med Chil (2002); 130 : 1043-1050.

American Academy of Periodontology (AAP). Periodontal diseases: Pathogenesis and microbial factors. Ann Periodontol (1996); 1: 926-932.

American Academy of Periodontology (AAP). Internatioal workshop for a classification of periodontal diseases and microbial factors. Ann Periodontol (1999); 21: 7-209.

Armitage GC. Diagnosis of periodontal diseases. J Periodontol (2003); 74: 1237-1247

Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S, Graves DT. IL-1 and TNF Antagonists Inhibit the Inflammatory Response and Bone Loss in Experimental Periodontitis. J Immunol (1998); 160: 403-409.

Beck JD, GarciaRG, Heiss G, Vokonas P, Offenbacher S. Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol (1996); 67 (suppl.):1123-1137.

Bendtzen K, Morling N, Fomsgaard A, Svenson M, Jakobsen B, Odum N, Svejgaard A. Association between HLA-DR2 and production of tumor necrosis factor α and interleukin-1 by mononuclear cells activated by lipopolysaccharide. Scan J Immunol (1988); 28 : 599-606.

Bidwell J, Keen L, Gallagher G, Kimberley R, Huizinga T, McDermott MF, Oksenberg J, McNicholl J, Pociot F, Hardt C, D`Alfonso S. Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases. Gen Immunol (1999); 1: 3-19.

Birkedale-Hansen H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodont Res (1993); 28: 500-510.

Boch JA, Wara-Aswapati N, Auron PE. Interleukin 1 Signal Transduction-Current Concepts and Relevance to Periodontitis. J Dent Res (2001); 80: 400-407.

Boughman JA, Astemborski JA, Suzuki JB. Phenotyping assesment of early onset periodontitis in sibships. J Clin Periodontol (1992); 19: 233-239.

Bradshaw DJ, Marsh PD, Schilling KM, Cummins D. A modified chemostat system to study the ecology of oral biofilms. J Appl Bacteriol (1996); 80: 124-130.

Busscher HF, Bos R, van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. FEMS Microbiol Lett 1995: 128; 229-234.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE,Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Ann Rev Microbiol (1995), 49:711-745.

Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D,Caldwell D,Korber DR, James G. Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol (1994); 176:2137-2142.

Craandijk J, van Krugten MV, Verweij CL, van der Velden U, Loos BG. Tumor necrosis factor-alpha gene polymorphisms in relation to periodontitis. J Clin Periodontol (2002); 29: 28-34.

Czuszak CA, Sutherland DE, Billman MA, Stein SH. Prostaglandin E2 potentiates interleukin-1β induced interleukin-6 production by human gingival fibroblasts. J Clin Periodontol (1996); 23: 635-640.

Darveau RP, Tanner A, Page RC . The microbial challenge in periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 12-32.

De Jong BA, Westebdorp RG, Bakker AM, Huizinga TW. Polymorphisms in or near tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha)-gene do not determine levels of endotoxin-induced TNF production. Genes Immun (2002); 3: 25-29.

Dennison DK, van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. Periodontology 2000, (1997); 14: 54-78.

Du Four A, Baran C, Langkamp HL, Piesco NP, Agarwal S. Regulation of differentiation of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells by rhIL-1β and rhTNF-α. J Periodont Res (1993); 28: 566-568.

Duan Y, Fisher E, Malamud D, Golub E, Demuth DR. Calcium-binding properties of SSP-5, the streptococcus gordonii M5 receptor for salivary agglutinin. Infect Immun (1994); 62: 5220-5226.

Ebersole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. The distribution of the antimikrobial protein , calciprotectin, in normal oral keratinocytes. Arch Oral Biol (1992); 37:1217-1226.

Eckman L, Jung H, Yang SK, Panja A, Fierer J, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. J Clin Invest (1995); 95: 55-65.

Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ. Periodontal disase in non-insulin dependent diabetes mellitus. J Periodontol (1991); 62: 123-131.

Endo M, Thai H, Tabeta K, Kobayashi T, Yamazaki K, Yoshie H. Analysis of single nucleotide polymorphisms in the 5`- flanking region of tumor necrosis factor-alpha gene in Japanese patients with early-onset periodontitis. J Peridontol (2001); 72: 1554-9.

Fiero D, Langkamp H, Piesco N, Kewitt G, johns L, Agarwal S. Characterization of human oral epithelial cell immune response J Dent Res (1995); 74: 540.

Firestein G. A new murine CD4+ T cell subset with an unrestricted cytokine profile. J Immunol (1989); 143: 518-525.

Fujihashi K, Kono Y, Beagley KW,Yamamoto M, McGheeJR, Mestecky J, Kiyono H. Cytokines and periodontal disease: Immunopathological role of interleukines for B cell responses in chronic inflamed gingival tissues. J Periodontol (1993); 64: 400-406.

Galbraith GM, Hendley TM, Sanders JJ, Palesch Y, Pandey JP. Polymorphic cytokine genotypes as markers of disease severity in adult periodontitis. J Clin Periodontol (1999); 26: 705-709.

Galbraith GMP, Hagan C, Steed RB, Sanders JJ, Javed T. Cytocine Production by Oral and Peripheral Blood Neutrophils in Adult Periodontitis. J Periodontol (1997); 68: 832-838.

Galbraith GMP, Steed RB, Sanders JJ, Pandey JP. Tumor Necrosis Factor Alpha Production by Oral Leukocytes: Influence of Tumor Necrosis Factor Genotype. J Periodontol (1998) ; 69: 428-33.

Gemmel E, Seymour GJ. T-Lymphocytes in human periodontal disease tissue. J Periodontol (1995); 66: 780-785.

Gemmell E, Marshall RI, Seymour GJ. Cytokines and prostaglandines in immune homeostasis and tissue destruction in periodontal disease. Periodontology 2000 (1997); 14: 112-143.

Gemmell E, Seymour GJ. Interleukin I, Interleukin 6 and transforming growth factor-beta production by human gingival mononuclear cells following stimulation with porphyromonas gingivalis and fusobacterium nucleatum. J Periodont Res (1993); 28: 122-129.

Gemmell E, Walsh LJ, Savage NW, Seymour GJ. Adhesion molecule expression in chronic inflammatory periodontal disease tissue. J Periodontol Res (1994); 29: 46-53.

Genco RJ, Slots J. Host responses in periodontal diseases. J Dent Res (1984); 63:441.

Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. J Periodontol (1996); 67:1041-1049.

Genco RJ. Host responses in periodontal diseases: current concepts. J Periodontol (1992); 63: 338-355.

Graves DT, Delima AJ, Assuma R, Amar S, Oates T, Cochran D. Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration towards alveolar bone in experimental periodontitis. J Periodontol (1998); 69: 1419-25.

Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. Cur Opin in Infect Disease (2000); 13: 227-232.

Graves DT. The potential role of chemokines and inflammatory cytokines in peridontal disease progression. Clin Infect Dis (1999); 28: 482-90.

Grbic JT, Singer RE, Jans HH, Celenti RS, Lamster IB. Immunoglobulin isotypes in gingival crevicular fluid: possible protective role of IgA. J Periodontol (1995); 66:55-61.

Grenier D, Belanger M. Protective effects of porphyromonas gingivalis outer membrane vesicles against bacteroidal activity of human serum. Infect Immun (1991); 59: 3004-3008.

Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. Cellular signalling (2001); 13: 85-94.

Gwinn MR, Sharma A, De Nardin E. Single nucleotide polymorphisms of the N-formyl peptide receptor in localized juvenile periodontitis. J Periodontol (1999); 70: 1194-1201.

Haanen JB, de Waal Malefijt R, Res PC, Kraakman EM, Ottenhoff TH, de Vries RR, Spits H. Selection of a human T-helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. J Exp Med (1991); 174: 583-592.

Haffajee AD, Socransky SS, Smith , Dibart S. Microbial risk indikators for periodontal attachment loss. J Periodontol Res (1991); 26: 293-296.

Hajeer AH, Hutchinson IV. Influence of TNFalpha gene polymorphisms on TNFalpha production and disease. Hum Immunol (2001); 62: 1191-1199.

Hamada S, Takada H, Ogawa T, Fujiwara T, Mihara J. Lipopolysaccharides of oral anaerobes associated with chronic inflammation : chemical and immunomodulating properties. Int Rev Immunol (1990); 6: 247-261.

Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S, Frenzel H, King K, Hasselmeyer A, Mc Pherson AJS, Bridger S, van Deventer S, Forbes A, Nikolaus S, Lennard-Jones JE, Foelsch UR, Krawczak M, Lewis C, Schreiber S, Mathew CG. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn´s disease in German and British populations. Lancet (2001); 357: 1925-1928.

Hart TC, Kornman KS. Genetic factors in the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 202-215.

Hassell TM, Harris EL. Genetic influences in caries and periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med (1995); 6: 319-324.

Hayashi S, Watanabe J, Kawajiri. Genetic polymorphisms in the 5´-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. J Biochem (1991); 110: 559

Hedges S, Agace W, Svensson M, Sjögren AC, Ceska M, Svanborg C. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. Infect Immun (1994); 62: 2315-2321.

Henning BJ, Parkhill JM, Chapple IL, Heasman PA, Taylor JJ. Association of a vitamin D receptor gene polymorphism with localized early-onset periodontal diseases. J Periodontol (1999); 70: 1032-1038.

Hoffmann SC, Stanley EM, Cox ED, DiMercurio BS, Koziol DE, Harlan DM, Kirk AD, Blair PJ. Ethnicity greatley influences cytokine gene polymorphism distribution. Am J Transplant (2000); 2; 560-567.

Hohjoh H. Tokunaga K. Allele-specific binding of the ubiquitous transcription factor OCT-1 to the functional single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the tumor necrosis factor alpha gene promoter. Genes Immun (2001); 2: 105-109.

Hoyle BD, Jass J, Costerton JW. The biofilm glycocalyx as a resistance factor. J Antimicrob Chemother (1990); 26:1-6.

Hsu SD, Cisar JO, Sandberg AL, Kilian M. Adhesive properties of viridans streptococcal species . Microb Ecol Health Dis (1994); 7: 125-137.

Ishikawa I, Nakashima K, Koseki T, Nagasawa T, Watanabe H, Arakawa S, Nitta H, Nishihara T. Induction of the immune response to periodontopathic bacteria and ist role in the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 79-111.

Jongeneel CV, Briant L, Udalova IA, Sevin A, Nedospasov SA, Cambon-Thomsen A. Extensiv genetic polymorphism in the human tumor necrosis factor region and relation to extend HLA haplotypes. Proc Natl Acad Sci USA (1991); 88: 9717- 21.

Kaijzel EL, van Krugten MV, Brinkman BM, Huizinga TW, van der Straaten T, Hazes JM, Ziegler-Heitbroek HW, Nedospasov SA, Breedveld FC, Verweij CL. Functional analysis of a human tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism related to joint damage in rheumatoid arthritis. Mol Med (1998); 4: 724-733.

Khoury AE, Lam K, Ellis BD, Costerton JW. Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. Am Soc Artif Intern Organs (1992); 38: 174-178.

Kinane DF, Adonogianski E, Moughal N, Winstanley FP, Mooney J, Thornhill M. Immunocytochemical characterization of cellular infiltrate, related endothelial changes and determination of GCF acute phase proteins during human experimental gingivitis. J Periodont Res (1991); 26: 286-288.

Kinane DF, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumor necrosis factor loci in early-onset periodontitis. J Periodont Res (1999); 34: 379-386

Kinane DF. Susceptibility and risk factors in periodontal disease. Ann R Australas Coll Dent Surg (2000); 15: 42-50.

Kobayashi T, Yamamoto K, Sugita N, van der Pol WL, Yasuda K, Kaneko S, Van de Winkel JG, Joshie H. The Fc gamma receptor genotype as a severity factor for chronic periodontitis in japanese patients. J Periodontol (2001); 72 : 1324-1331.

Kornman KS, Crane A, Wang HY, di Giovane FS, Newman MG, Pirk FW, Wilson TG, Higginbottom FL, Duff GW. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. J Clin Periodontol (1997); 24: 72-77.

Kornman KS, di Giovine FS. Genetic Varations in Cytokine Expression: A Risk Factor for Severity of Adult Periodontitis. Ann Periodontol (1998); 3: 327-38.

Kornman KS, Knobelman C, Wang HY. Is periodontitis genetic? The answer may be yes! J Mass Dent Soc (2000); 49: 26-30.

Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. Periodontology 2000 (1997); 14: 33-53.

Krejci CB, Bissada NF. Periodontitis- the risks for ist development. Gen Dent (2000); 48: 430-436.

Kroeger KM, Carville KS, Abraham LJ. The –308 tumor necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription. Mol Immun (1997); 34: 391-399.

Kroeger KM, Steer JH, Joyce DA, Abraham LJ. Effects of stimulus and cell type on the expression of the –308 tumor necrosis factor promoter polymorphism. Cytokine (2000); 12: 110-119.

Laine ML, Farre MA, Garcia-Gonzalez MA, van Dijk LJ, Ham AJ, Winkel EG, Crusius JB, Vandenbroucke JP, van Winkelhoff AJ, Pena AS. Risk factors in adult periodontitis: polymorphism in the interleukin-1gene family. Ned Tijschr Tandheelkd (2002); 108: 303-306.

Lamont RJ, Bevan CA, Gil S, Persson RE. Involvement of Porphyromonas gingivalis fimbriae in adherence to Streptococcus gordonii. Oral Microbiol Immunol (1993); 8: 272-276.

Listgarten MA. The structure of dental plaque. Periodontol 2000 (1994); 5: 22-65.

Loesche WJ. The antimicrobial treatment of periodontal disease: changing the treatment paradigm. Crit Rev Oral Biol Med (1999); 10: 245-275.

Long JC, Nance WE, Waring P, Burmeister JA, Ranney RR. Early onset periodontitis: a comparison and evaluation of two proposed modes of inheritance. Genet Epidemiol (1987); 4: 13-24.

Loppnow H, Brade H, Dürrbaum I, Dinarello CA, Kusukoto S, Rietschel ET, Flad HD. IL-1 induction-capacity of defined lipopolysaccharide partial structures. J Immunol (1989); 142: 3229-3238.

Lorenz E, Frees KL, Schwartz DA. Determination of the TLR4 genotype using allel-specific PCR. Bio Tech (2001); 31: 22-24.

Louis E, Franchimont D, Piron A, Gevaert Y, Schaaf- Lafontaine N, Roland S, Mahieu P, Malaise M, de Groote D, Louis R, Belaiche J. Tumor necrosis factor (TNF) gene Polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. Clin Exp Immunol (1998); 113: 401-406.

Low AS, Azmy I, Sharaf N, Cannings C, Wilson AG. Associotion between two tumor necrosis factor intronic polymorphisms and HLA allels. Eur J Immunogenet (2002); 29: 31-34.

Lowenguth RA, Chin I, Caton JG, Cobb CM, Drisko CL, Killoy WJ. Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: microbial response. J Periodontol (1995); 66:700-707.

Maeda T, Sodeyama T, Hara K, Takamo Y. Evidence for the existence of intraepithelial nerve endings in the junctional epithelium of rat molars: an immunohistochemical study using protein gene product 9.5 (PGP 9.5) antibody. J Periodont Res (1994); 29: 377-385.

Marazita ML, Burmeister JA, Gunsolley JC, Koertge TE, Lake K, Schenkein HA. Evidence for autosomal dominant inheritance and race-specific heterogenity in early onset periodontitis. J Periodontol (1994); 65: 623-630.

Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. J Ind Microbiol (1995); 15: 169-175.

Mc Dewitt MJ, Wang HY, Knobelman C, Newman MG, de Giovine FS, Timms J, Duff GW, Kornman KS. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. J Periodontol (2000); 2: 156-163.

Mc Farlane CG, Reynolds JJ, Meikle MC. The release of interleukin 1-beta, tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with periodontitis. J Periodont Res (1990); 26: 207-14.

Mc Guire W, Hill AV, Allsopp CE, Greenwood BM, Kwiatowski D. Variation in the TNFα promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria. Nature (1995); 371: 508-510.

Meikle MC, Hembry RM, Holley J, Horton C, Mc Farlane CG, Reynolds JJ. Immunolocalization of matrix-metalloproteinases and TIMP-1(tissue inhibitor of metalloproteinasas) in human gingival tissue from periodontitis patients. J Periodont Res (1994); 29: 118-126.

Meyle J. Neutrophil Chemotaxis and serum concentration of tumor- necrosis-factor-α (TNFA). J Periodont Res (1993); 28: 491-493.

Michalowicz BS, Aeppli D, Virag JG, Klump DG, Hinrichs JE, Segal NL, Bouchard TJ, Pihlstrom BL. Periodontal findings in adult twins . J Periodontol (1991); 62: 293-199.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids research (1988); 16: 1215.

Miyasaki KT, Bodeau AL, Pohl J, Shafer WM. Bactericidial activities of synthetic human leukocyte cathepsin G-derived antibiotic peptides and congeners against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Capnocytophaga sputigena. Antimicrob Agents Chemother (1993); 37: 2710-2715.

Molvig J, Baek L, Christensen P, Manogue KR, Vlassara H, Platz P, Nielsen LS, Svejgaard A, Nerup J. Endotoxin stimulated human monocyte secretion of interleukin -1, tumor necrosis factor alpha, and prostaglandin E2 shows stable interindividual differences. Scand. J Immunol (1988); 27: 705-716.

Mombelli A, Casagni F, Madianos PN. Can presence or absence of periodontal pathogens distinguish between subjects with chronic and aggressive periodontitis? A systematic review. J Periodontol (2002); 29: 10-21.

Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets : Th1, Th2 and more. Immunol Today (1996); 17: 138-146.

Moughal NA, Adonogianaka E, Thornhill MH, Kinane DF. Endothelial cell leukocyte adhesion molecule -1 (ELAM-1) and intracellular adhesion molecule -1 (ICAM-1) expression in gingival tissue during health and experimentally induced gingivitis. J Periodont Res (1992), 27: 623-630.

Nagasawa T, Nitta H, Watanabe H, Ishikawa I. Reduced CD8+ peripheral blood lymphocytes in rapidly progressive periodontitis. Arch Oral Biol (1995); 40: 605-608.

Newton CR, Graham A. PCR. 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford (1994).

Nyman S, Lindhe J. Examination of patients with periodontal disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP: Clinical periodontology and implant dentistry. Munksgaard ; Copenhagen 383-395 (1997).

Offenbacher S, Collins JG, Arnold RR. New clinical diagnostic strategies based on pathogenesis of disease. J Periodont Res (1993); 28: 523-535.

Offenbacher S, Farr DH, Goodson JM. Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid . J Clin Periodontol (1981); 8: 319-327.

Offenbacher S. Periodontal disease: pathogenesis. Ann Periodontol (1996); 1:821-878.

Ory PA, Clark MR, Kwoh EE, Clarkson SB, Goldstein IM. Sequences of complementary DNAs that encode the NA1 and NA2 forms of Fc receptor III on human neutrophils . J Clin Invest (1989); 84: 1688-1691.

Ory PA, Goldstein IM, Kwoh EE, Clarkson SB. Characterization of polymorphic forms of Fc receptor III on human neutrophils . J Clin Invest (1989); 84: 1676-1681.

Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. Periodontology 2000 (1997); 14: 216-268.

Page RC, Schroeder HE. Current status of the host response in chronic marginal periodontitis. J Periodontol. (1981); 52:477.

Page RC. Milestones in periodontal research and the remaining critical issues. J Periodont Res (1999); 34: 331-339.

Page RC. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. J Periodont Res (1991); 26: 230-242.

Paliard X, de Waal Malefijt R, Yssel H, Blanchard D, Chretien I, Abrams J, de Vries J, Spits H. Simultaneous production IL-2, IL-4, and IF-γ by human CD4+ and CD8+ T-cell clones. J Immunol (1988); 141: 849-855.

Papapanou PN, Baelum V, Luan WM, Madianos PN, Chen X, Fejerskov O, Dahlen G. Subgingival microbiota, in adult Chinese. Prevalence and relation to periodontal disease progression. J Periodontol (1997); 68: 651-666.

Parren PWHI, Warmerdam PAM, Boeije LCM, Arts J, Westerdaal NAC, Vlug A, Capel PJA, Aarden LA, van de Winkel JGJ. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes neutrophils, and platelets. J Clin Invest (1992); 90: 1537-1546.

Pociot F, Briant L, Jongeneel CV, Molvig J, Worsaae H, Abbal M, Thomsen M, Nerup J, Cambon-Thomsen A. Association of t tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex allals with the secretion of TNF-alpha and TNF-beta by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. Eur J Immunol (1993); 23: 224-231.

Pociot F, D`Alfonso S, Compasso S, Scorza R, Richiardi PM. Functional analysis of a new polymorphism in the human TNFα gene promoter. Scan J Immunol (1995); 42: 501-504.

Pugin J, Heuman D, Tomasz A, Kravchenko W, Akamatsu Y, Nishijama M, Glauser MP, Tobias PS, Ulevitch RJ. CD 14 is a pattern recognition receptor. Immunity (1994); 1: 509-516.

Pugin J, Schurer-Maly CC, Leturcq D, Moriarty A, Ulevitch RJ, Tobias PS. Lipopolysaccharide activation of human endothelial and epithelial cells is mediated by lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD 14. Proc Nat Acad Sci USA (1993); 90: 2744-2748.

Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanism of connective tissue Matrix destruction in periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 144-157.

Roberts FA, Mc Caffery KA, Michalesk SM. Profile of Cytokine mRNA Expression in Chronic Adult Periodontitis. J Periodont Res (1997); 76: 1833-9.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. Science (1991); 254: 279-282.

Salvi GE, Lawrence HP, Offenbacher S, Beck JD. Influence of risk factors on the pathogenesis of periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 173-201.

Sanders LAM, Feldman RG, Voorhorts-Ogink MM, DeHaas M, Rijkers GT, Capel PJ, Zegers BJ, Van der Winkel JG. Human immunglobulin G (IgG) Fc receptor IIA (CD 32) polymorphism and IgG2-mediated bacterial phagocytosis by neutrophils. Infect Immun (1995); 63: 73-81.

Scannapieco FA. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. Crit Rev Oral Bio Med (1994); 29: 62-69.

Scarel-Caminaga RM, Trevilatto PC, Suoza AP, Brito RB, Line SR. Investigation of an IL-2 polymorphism in patients with different levels of chronic periodontitis. J Clin Periodontol (2002); 29: 587-591

Schmitt C, Humeny A, Becker CM, Brune K, Pahl A. Polymorphisms of TLR4: Rapid genotyping and reduced response to lipopolysaccharide of TLR4 mutant allels. Clin Chem (2002); 48: 1661-1667.

Schroeder HE. Pathobiologie oraler Strukturen: Zähne, Pulpa, Parodont. Karger, Basel (1991)

Schwartz J, Stinson FL, Parker RP. The passage of trittiated bacterial endotoxin across intact gingival crevicular epithelium. J Periodontol (1972); 43: 270-276.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. Periodontology 2000 (1997); 14: 158-172.

Seymour GJ, Gemmell E, Reinhardt RA, Eastcott J, Taubman MA. Immunopathogenesis: cellular and molecular mechanisms. J Periodont Res (1993); 28: 478-486.

Shapira L, Stabholz A, Rieckmann P, Kruse N. Genetic polymorphism of the tumor necrosis factor (TNF)-alpha promoter region in families with localized early-onset periodontitis. J Periodontal Res (2001) Jun; 36: 183-6.

Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ, Genco RJ. Type 2 diabetes mellitus and periodontal disease. J Am Dent Assoc (1990); 121: 532-536.

Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith CM, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. J Clin Periodontol (1998); 25: 134-144.

Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillmann JD. Associations between microbial species in subgingival Plaque samples . Oral Microbiol Immunol (1988); 3: 1-7.

Street NE, Schumacher JH, Fong TA, Bass H, Fiorentino DF, Leverah JA, Mosmann TR. Heterogenity of mouse helper T cells. Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. J Immunol (1990); 144: 1629-1639.

Tanaka T, Kido MA, Ibuki T, Amaza T, Kondo T, Nagata E. Immunocytochemical study of nerve fibres containing substance P in the junctional epithelium of rats. J Periodont Res (1996); 31: 187-194.

Temelsen DS, McGrath HE, Kittler EL, Shadduck RK, Kister VK, Crittenden RB, Turner BL, Quesenberry PJ. Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. Exp Hematol (1993); 21: 388-393.

Tonetti MS, Gerber L, Lang NP. Vascular adhesion molecules and initial development of inflammation in clinical healthy human keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. J Periodont Res (1994); 29: 386-392.

Tonetti MS, Schmid J, Hämmerle CH, Lang NP. Intraepithelial antigen presenting cells in the keratinized mucosa around teeth and osseointegrated implants. Clin Oral Impl Res (1993); 4: 177-186.

Tonetti MS. Molecular factors associated with compartmentalization of gingival immune response and transepithelial neutrophil migration. J Periodont Res (1997); 32: 104-107.

Tonetti MS, Mombelli A. Early-Onset Periodontitis. Ann Periodontol (1999); 4: 39-52.

Tracey KJ, Vlassara H, Cerami A. Cachectin/ tumor necrosis factor. Lancet (1989); 1:1133-1125.

Van Dyke TE, Lester MA, Shapira L. The role of the host response in periodontal disease progression: Implications for future treatment strategies. J Periodontol (1993); 64: 792.

Van Dyke TE, Vaikuntam J. Neutrophil function and dysfunction in periodontal disease. Curr Opin Periodontol (1994); 1: 19-27.

Van Heekeren AM, Rikihisa Y, Park J, Fertel R. Tumor necrosis factor alpha, interleukin-1 alpha, interleukin-6, and prostaglandin E2 production in murine peritoneal macrophage infected with Ehrlichia risticii. Infect Immun (1993); 61: 4333-4337.

Warmerdam PAM, van de Winkel JGJ, Vlug A, Westerdaal NAC, Capel PJA. A single amino acid in the second Ig-like domain of the human Fcγ receptor II is critical for human IgG2 binding. J Immunol (1991); 147: 1338-1343.

Westendorp RG, Langermans JA, Huizinga TW, Elouali AH, Verweij CL, Boomsma DI, Vandenbroucke JP. Genetic Influence on cytokine production and fatal meningococcal disease. Lancet (1997); 349: 170-173.

Whittaker CJ, Klier CM, Kolenbander PE. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. Annu Rev Microbiol (1996); 50: 513-552.

Wiebe CB, Putnins EE. The Periodontal Disease Classification System of the American Academy of Periodontology - An Update. J Can Dent Assoc (2000); 66: 594-597.

Wilson AG, de Vries N, Pociot F, di Giovine FS, van der Putte LBA, Duff GW. An allelic Polymorphism within the Human Tumor Necrosis Factor α Promotor Region Is Strongly Associated with HLA A1, B8, and DR3 Alleles. J Exp Med (1993); 177: 557-560.

Wilson AG, Symons JA, Mc Dowell TL, McDevitt HO, Duff GW. Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transscriptional activation. Proc Natl Acad Sci USA (1997); 94: 3195- 99.

Wilson ME, Bronson PM, Hamilton RG. Immunglobulin G2 antibodies promote neutrophil killing of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun (1995); 63: 1070-1075.

Wilson ME, Hamilton RG. Immunglobulin G subclass response of juvenile periodontitis subjects to principal outer membrane proteins of Actinobacillus actinomycetemcomitans. Infect Immun (1995); 63: 1062-1069.

Wu WS, McClain KL. DNA polymorphisms and mutation of the tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) promoter in Langerhans cell histiocytosis (LCH). J Cyt Res (1997); 17: 631-635.

Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T. Purification and Characterisation of a novel Type of Fimbriae from the oral anaerob Bacteroides gingivalis. J Bacteriol (1984);16: 949-957.

10 Anhang

10.1 Tabellen

10.1.1 Untersuchungsgruppe

Proben-nummer	Alter des Patienten	Geschlecht	TNF-α-Genotyp	Klassifikation
P 1	56 Jahre	männlich	GG	moderat
P 2	31 Jahre	weiblich	GG	schwer
P 3	50 Jahre	weiblich	GG	moderat
P 4	37 Jahre	weiblich	GG	schwer
P 5	38 Jahre	weiblich	GG	moderat
P 6	30 Jahre	männlich	GG	schwer
P 7	41 Jahre	weiblich	AA	schwer
P 8	24 Jahre	männlich	GA	schwer
P 9	39 Jahre	männlich	GA	schwer
P10	?? Jahre	weiblich	GG	moderat
P11	50 Jahre	weiblich	GG	moderat
P12	18 Jahre	weiblich	GG	moderat
P13	50 Jahre	weiblich	GA	mild
P14	56 Jahre	weiblich	GA	moderat
P15	63 Jahre	weiblich	GA	mild
P16	58 Jahre	männlich	GG	mild
P17	54 Jahre	weiblich	GA	mild
P18	54 Jahre	männlich	GG	schwer
P19	60 Jahre	weiblich	GG	mild
P20	61 Jahre	männlich	GG	moderat

P21	31 Jahre	weiblich	GG	schwer
P22	57 Jahre	männlich	GA	moderat
P23	28 Jahre	männlich	GA	schwer
P24	?? Jahre	männlich	GA	moderat
P25	63 Jahre	weiblich	GA	moderat
P26	58 Jahre	weiblich	GA	moderat
P27	50 Jahre	weiblich	GG	mild
P28	64 Jahre	weiblich	GA	schwer
P29	58 Jahre	männlich	GG	mild
P30	49 Jahre	weiblich	GG	moderat
P31	42 Jahre	männlich	GG	moderat
P32	54 Jahre	weiblich	GG	mild
P33	58 Jahre	weiblich	GG	mild
P34	57 Jahre	weiblich	GA	mild
P35	48 Jahre	weiblich	GA	mild
P36	61 Jahre	weiblich	GA	moderat
P37	40 Jahre	weiblich	GG	schwer
P38	55 Jahre	weiblich	GG	mild
P39	69 Jahre	männlich	GG	moderat
P40	33 Jahre	männlich	GA	schwer
P41	62 Jahre	männlich	GG	mild
P42	57 Jahre	männlich	GG	mild
P43	26 Jahre	weiblich	GA	schwer
P44	61 Jahre	männlich	GA	moderat
P45	50 Jahre	weiblich	GA	moderat
P46	?? Jahre	männlich	GA	schwer
P47	?? Jahre	weiblich	GG	schwer
P48	66 Jahre	weiblich	GA	mild

P49	?? Jahre	weiblich	GG	mild
P50	31 Jahre	weiblich	GG	moderat
P51	60 Jahre	weiblich	GG	moderat
P52	70 Jahre	männlich	GG	mild
P53	?? Jahre	weiblich	GG	mild
P54	?? Jahre	männlich	GA	schwer
P55	32 Jahre	männlich	GG	moderat
P56	57 Jahre	weiblich	GG	schwer
P57	38 Jahre	männlich	GG	moderat
P58	58 Jahre	weiblich	AA	moderat
P59	58 Jahre	männlich	GG	mild
P60	58 Jahre	weiblich	GG	moderat
P61	48 Jahre	männlich	GG	mild
P62	?? Jahre	weiblich	GA	moderat
P63	37 Jahre	männlich	GG	mild
P64	58 Jahre	männlich	GA	moderat
P65	25 Jahre	männlich	GG	moderat
P66	54 Jahre	männlich	GG	schwer
P67	64 Jahre	männlich	GA	moderat
P68	45 Jahre	männlich	GG	moderat
P69	40 Jahre	weiblich	GG	schwer
P70	58 Jahre	männlich	GG	schwer
P71	63 Jahre	weiblich	GG	moderat
P72	56 Jahre	männlich	GG	schwer
P73	62 Jahre	männlich	GA	mild
P74	43 Jahre	männlich	GA	mild
P75	43 Jahre	männlich	GG	moderat
P76	60 Jahre	männlich	GG	schwer

P77	49 Jahre	männlich	GG	schwer
P78	53 Jahre	männlich	GG	schwer
P79	58 Jahre	weiblich	GG	moderat
P80	36 Jahre	weiblich	GG	mild
P81	61 Jahre	männlich	GG	moderat

10.1.2 Kontrollgruppe

Proben-nummer	Alter des Patienten	Geschlecht	TNF-α-Genotyp
N 1	44 Jahre	weiblich	GG
N 2	55 Jahre	männlich	GG
N 3	47 Jahre	weiblich	GA
N 4	32 Jahre	weiblich	GG
N 5	33 Jahre	männlich	GG
N 6	60 Jahre	männlich	GG
N 7	62 Jahre	weiblich	GG
N 8	22 Jahre	weiblich	GG
N 9	24 Jahre	weiblich	GG
N10	34 Jahre	weiblich	GG
N11	50 Jahre	männlich	GG
N12	45 Jahre	männlich	GA
N13	28 Jahre	weiblich	GA
N14	52 Jahre	weiblich	GG
N15	21 Jahre	weiblich	GG
N16	29 Jahre	männlich	GG
N17	46 Jahre	weiblich	GG
N18	38 Jahre	männlich	GG
N19	46 Jahre	männlich	GG
N20	47 Jahre	weiblich	GG
N21	58 Jahre	weiblich	GG
N22	45 Jahre	männlich	GG
N23	44 Jahre	weiblich	GG
N24	41 Jahre	männlich	GA
N25	43 Jahre	weiblich	GA
N26	67 Jahre	männlich	GG
N27	62 Jahre	weiblich	GG
N28	42 Jahre	weiblich	GG
N29	36 Jahre	weiblich	GA
N30	45 Jahre	weiblich	GG

Die Proben Nr. N31 – N35 mußten wegen defekter Zellkulturen verworfen werden.

N36	46 Jahre	männlich	GG
N37	73 Jahre	männlich	GG
N38	25 Jahre	männlich	GG
N39	35 Jahre	weiblich	GG
N40	61 Jahre	männlich	GA
N41	19 Jahre	weiblich	GA
N42	24 Jahre	weiblich	GA
N43	38 Jahre	männlich	GG
N44	55 Jahre	männlich	GG
N45	43 Jahre	männlich	GA
N46	41 Jahre	männlich	GA
N47	61 Jahre	männlich	GG
N48	41 Jahre	männlich	GG
N49	36 Jahre	weiblich	GG
N50	59 Jahre	männlich	GA
N51	38 Jahre	weiblich	GG
N52	55 Jahre	männlich	GG
N53	31 Jahre	weiblich	GG
N54	42 Jahre	männlich	GG
N55	63 Jahre	weiblich	GG
N56	60 Jahre	weiblich	GG
N57	25 Jahre	männlich	GA
N58	35 Jahre	männlich	GG
N59	21 Jahre	männlich	GG
N60	50 Jahre	männlich	GG
N61	42 Jahre	männlich	GG
N62	41 Jahre	männlich	GG
N63	34 Jahre	weiblich	GG
N64	25 Jahre	männlich	GA
N65	57 Jahre	männlich	GG
N66	43 Jahre	männlich	GG
N67	29 Jahre	männlich	GA
N68	65 Jahre	weiblich	GA
N69	62 Jahre	weiblich	GG

N70	45 Jahre	männlich	GG
N71	34 Jahre	männlich	GG
N72	18 Jahre	männlich	GA
N73	54 Jahre	weiblich	GG
N74	47 Jahre	weiblich	GA
N75	47 Jahre	weiblich	GA
N76	42 Jahre	männlich	GG
N77	18 Jahre	weiblich	GG
N78	19 Jahre	weiblich	GA
N79	40 Jahre	männlich	GA
N80	18 Jahre	weiblich	GA
N81	41 Jahre	männlich	GG
N82	40 Jahre	weiblich	GA
N83	40 Jahre	männlich	GG
N84	47 Jahre	männlich	GG
N85	25 Jahre	männlich	GG
N86	22 Jahre	männlich	GA
N87	32 Jahre	männlich	GA
N88	62 Jahre	männlich	GG
N89	56 Jahre	männlich	GG
N90	25 Jahre	weiblich	GG
N91	43 Jahre	männlich	GG
N92	26 Jahre	männlich	GA
N93	25 Jahre	männlich	GG
N94	34 Jahre	männlich	GA
N95	44 Jahre	männlich	GA
N96	50 Jahre	männlich	GA
N97	26 Jahre	weiblich	GG
N98	32 Jahre	männlich	GG
N99	31 Jahre	männlich	GG
N100	27 Jahre	männlich	GG
N101	34 Jahre	männlich	GG
N102	29 Jahre	männlich	GA
N103	20 Jahre	weiblich	GG

N104	27 Jahre	weiblich	GG
N105	22 Jahre	weiblich	GG
N106	25 Jahre	weiblich	GA
N107	21 Jahre	männlich	AA
N108	58 Jahre	männlich	GA
N109	32 Jahre	männlich	GA
N110	32 Jahre	männlich	GG
N111	25 Jahre	männlich	GG
N112	40 Jahre	männlich	GG
N113	25 Jahre	männlich	GG
N114	40 Jahre	weiblich	GG
N115	45 Jahre	männlich	GA
N116	35 Jahre	männlich	GA
N117	62 Jahre	männlich	GG
N118	30 Jahre	männlich	GG
N119	37 Jahre	männlich	GG
N120	21 Jahre	weiblich	GG
N121	20 Jahre	männlich	GA
N122	Keine Daten vorhanden		
N123	55 Jahre	männlich	GA
N124	45 Jahre	männlich	GG
N125	36 Jahre	weiblich	GA
N126	27 Jahre	weiblich	GG
N127	27 Jahre	männlich	GG

10.2 Danksagung

Zu danken habe ich in erster Linie Herrn PD Dr. Dr. Matthias Folwaczny für die Überlassung des Themas und sein Engagement sowie die Unterstützung bei der Betreuung der Arbeit.

Frau Helga Török und Herrn Jürgen Glas möchte ich danken für die große Hilfsbereitschaft bei den Arbeiten im Labor und der Beantwortung aller diesbezüglichen Fragen.

Herr Daniel Mauermann war mir stets ein beratender und zuverlässiger Partner während der ganzen Zeit. Ihm wünsche ich viel Erfolg bei seiner eigenen Dissertation.

Allen nicht genannten Kollegen und Helfern sowie den Patienten gilt mein herzlicher Dank; ohne sie wäre die Arbeit nicht zustande gekommen.

Meinen Eltern bin ich zutiefst verbunden für die persönliche Anteilnahme an der Arbeit sowie deren abschließende Durchsicht.

10.3 Lebenslauf

Persönliches:

Name:	Monika Manuela Mende
Geburtsdatum:	18. 08. 1976
Geburtsort:	München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Christa Mende, Lehrerin
	Dr. Walter Mende, Arzt

Schulbildung:

1983-1987	Grundschule an der Plinganserstraße, München
1987-1996	Dante-Gymnasium, München
28.06.1996	Allgemeine Hochschulreife

Studium:

1996-2002	Studium der Zahnmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
22.10.1997	naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung
21.10.1999	zahnärztliche Vorprüfung
12.07.2002	zahnärztliche Prüfung
25.07.2002	Erhalt der Approbation als Zahnärztin

Berufstätigkeit:

Seit 11.11.2002	Assistenzzahnärztin in der Praxis Dr. Klaus Brandner, Krailling